

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
DANIELLE NIFOCCI

Expressão recombinante do marcador de superfície de *Wolbachia* (α -
Proteobacteria, Rickettsiales) em sistema *cell-free*

Mogi das Cruzes
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
DANIELLE NIFOCCI

Expressão recombinante do marcador de superfície de *Wolbachia* (α -
Proteobacteria, Rickettsiales), em sistema *cell-free*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade
de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Prof. Orientador: Dr. Douglas Mascara

Mogi das Cruzes
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Nifoci, Danielle

Expressão recombinante do marcador de superfície de *Wolbachia* (α -Proteobacteria, Rickettsiales) em sistema *cell-free* / Danielle Nifoci. – 2010.

80 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2010

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios

Orientador: Prof. Dr. Douglas Mascara

1. Proteínas recombinantes 2. *wsp* 3. *Wolbachia* I. Mascara, Douglas

CDD 660.6



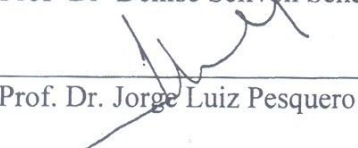
ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às catorze horas e trinta minutos do dia vinte e três de abril de dois mil e dez, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Expressão recombinante do marcador de superfície de Wolbachia (α -Proteobacteria, Rickettsiales) em sistema cell-free" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Danielle Nifoci**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Douglas Mascara da Universidade de Mogi das Cruzes, Denise Selivon Scheepmaker da Universidade de São Paulo, e Jorge Luiz Pesquero da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA por UNANIMIDADE
(aprovado(a) /reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 23 de abril de 2010.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Douglas Mascara

Prof.ª Dr.ª Denise Selivon Scheepmaker

Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

Julgamento
APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))
APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))
APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Douglas Mascara por sempre confiar na minha capacidade, me dando sempre ‘carta branca’ no laboratório. Por toda orientação nos experimentos, na vida profissional e pessoal. Sendo hoje muito mais do que um orientador, sendo um hoje um amigo muito querido. Vou sentir muita falta das nossas conversas ‘Teacher’!

A todos os colegas do laboratório: Eliane Batista, Erika Gonsalves, Silvana Silva, Rodrigo Souza, Fernando Mafra, Diego Watanabe, que de um jeito ou de outro estiveram envolvidos nesse trabalho sempre me ajudaram e incentivando.

A Prof. Dr. Regina de Oliveira e alunos por toda ajuda em diversos experimentos realizados no Laboratório de Genômica.

Aos amigos da Unifesp: Erica, Anderson Haro, Tiago Rosa e Sandro Soares me aguentando por semanas e semanas e sempre dispostos a ajudar em todos os experimentos.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Araujo por disponibilizar seus alunos e alguns equipamentos. E também pelos conselhos na fase de transição entre graduação e mestrado.

Ao Prof. Dr. Jorge Pesquero e seus alunos e colaboradores: Mércia, Yolanda, Deise e Ana por me receberem super bem e me ajudarem na etapa final e mais importante desse trabalho. E em especial ao Amigo Jorge Pesqueiro, por toda confiança e amizade que sempre teve em mim, desde a minha iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Fábio Kwasniewski pela amizade e incentivo.

Ao amigo João Daivison, que desde a minha iniciação científica esteve presente me ensinando e auxiliando em todos os experimentos e mesmo distante continuou me ajudando na fase do mestrado.

Ao Prof. Dr. Milton Rocha, sempre auxiliando nas partes burocráticas do projeto e também na diversão do laboratório. O laboratório seria menos alegre sem você Dr. Milton!

Ao meu pai, Ulisses Nifoci, pois sem o apoio dele não seria possível o meu ingresso na biotecnologia.

E a todos os amigos que mesmo entendendo um pouco ou não entendendo nada do trabalho estiveram sempre ao meu lado, apoiando, ajudando e aconselhando nas horas difíceis: Aline Pagotti, Alexandra Rocha, Bianca Penteado, Danielle Zanatta, Marcello Penteado, Márcia Galindo, Marcos Filó, Rachel Amancio, Tosh, Vivian Matsukura. Com certeza esse trabalho tem um pedacinho de todos vocês!

RESUMO

Wolbachia são bactérias endossimbiontes intracelulares obrigatórias conhecidas por infectar um vasto número de espécies de artrópodes e vermes nemátodos. O microorganismo está relacionado a alterações reprodutivas em seus hospedeiros tais como, feminização, partenogênese, morte prematura dos embriões machos e a incompatibilidade citoplasmática (IC). O objetivo do presente estudo foi o de obter a proteína marcadora da membrana de *Wolbachia*, a *wolbachia surface protein* (WSP) através da expressão recombinante desse peptídeo. Para tanto, foram desenhados *primers* específicos para a sequência WSP obtida a partir de hospedeiros distintos, *Aedes albopictus* e *Solenopsis saevissima*. Os procedimentos para a extração e amplificação foram realizados através de técnicas convencionais de reação em cadeia da polimerase (PCR). A sequência WSP foi então clonada em vetor (pEXP5-CT/TOPO[®]) e utilizada para a transformar bactérias competentes (*E. coli*/TOP10). As bactérias foram selecionadas de acordo com o sucesso da transformação e a orientação da clonagem da sequência-alvo (*frame*). Para tanto, foram desenvolvidos ensaios específicos através da combinação de iniciadores do vetor e do inserto. Foi utilizado um sistema *in vitro* – *cell free* (Invitrogen) para a expressão recombinante do inserto. O sucesso da expressão foi avaliado através de diversos métodos para evidenciar o peptídeo-alvo e a seguir o peptídeo marcador de *Wolbachia* foi purificado em sistema de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel. No presente estudo, obtivemos pela primeira vez a síntese do peptídeo WSP recombinante, em sistema *cell free*, derivado de ambos os hospedeiros. Através da comparação dos produtos peptídicos foi possível confirmar a existência de diferenças moleculares entre eles, o que permite supor que ensaios com vistas a síntese de anticorpos específicos para esses marcadores poderão ser *Wolbachia*-hospedeiro-específicos.

Palavras-chave: *Wolbachia*, *wsp*, proteína recombinante.

ABSTRACT

Wolbachia bacteria are intracellular obligatory endosymbionts known to infect a large number of species of arthropods and nematode worms. The organism is related to reproductive alterations in their hosts such as feminization, parthenogenesis, premature death of male embryos and cytoplasmic incompatibility (CI). The aim of this study was to obtain a membrane protein marker of *Wolbachia*, *Wolbachia surface protein* (WSP) by recombinant expression of this peptide. We designed primers specific for *wsp* sequence obtained from different hosts, *Aedes albopictus* and *Solenopsis saevissima*. The procedures for extraction and amplification were performed using conventional techniques of *polymerase chain reaction* (PCR). The WSP sequence was then cloned into vector (pEXP5-CT/TOPO[®]) and used to transform competent bacteria (*E. coli*/TOP10). The bacteria were selected according to the success of the transformation and orientation of the cloning of the target sequence (*frame*). Specific tests were developed through a combination of *primers* of the vector and the insert. We used an *in vitro* system – *cell-free* (Invitrogen) for recombinant expression of the insert. Successful expression was evaluated by several methods to evidence the target peptide and then the marker peptide of *Wolbachia* was purified from an affinity chromatography column Nickel. In this study, we obtained the first time the synthesis of WSP recombinant peptide in *cell free system*, derived from both hosts. By comparing the peptide products was possible to confirm the existence of molecular differences between them, which suggests that tests with a view to synthesis of specific antibodies to these markers may be *Wolbachia*-host-specific.

Keywords: *Wolbachia*, WSP, recombinant protein.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Modelo molecular hipotético de uma proteína transmembrana.....	16
Figura 2: Representação de reações de amplificação.....	29
Figura 3: Representação da combinação de <i>primers</i> na reação de amplificação.....	30
Figura 4: Produto de amplificação dos segmentos <i>wsp</i> e 28S rDNA em <i>Solenopsis saevissima</i> e <i>Aedes albopictus</i>	37
Figura 5: Comparação da sequência <i>wsp</i> obtida a partir de diferentes hospedeiros.....	38
Figura 6: Colônias de bactérias transformadas e semeadas em placa de Petri.....	38
Figura 7: Identificação das colônias transformadas e semeadas em placa de Petri numereada.....	39
Figura 8: Produto de amplificação a partir de colônias transformadas com vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro <i>Solenopsis saevissima</i>	40
Figura 9: Produto de amplificação a partir de colônias transformadas com vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro <i>Aedes albopictus</i>	41
Figura 10: Amplificação do produto da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro <i>Solenopsis saevissima</i>	42
Figura 11: Amplificação do produto da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro <i>Aedes albopictus</i>	43
Figura 12: Amplificação do produto da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro <i>Solenopsis saevissima</i>	44
Figura 13: Amplificação do produto da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro <i>Aedes albopictus</i>	45
Figura 14: Eficiência de transformação do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro <i>Solenopsis saevissima</i>	46
Figura 15: Eficiência de transformação do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro <i>Aedes albopictus</i>	46
Figura 16: Caracterização da sequência do inserto.....	49
Figura 17: Determinação do tempo de incubação.....	51
Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 12,5% corado com <i>Comassie Blue</i>	52
Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 12,5% corado com <i>InVision His-Tag</i>	53
Figura 20: Imunorreatividade à calda de histidina.....	54

Figura 21: Peptídeo *wsp* purificado por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel.....

Lista de Tabelas

Tabela 1. Quadro descritivo dos programas de amplificação de diferentes sequências em sistema <i>Polymerase Chain Reaction</i>	25
Tabela 2. Concentração de DNA total na solução de extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro <i>Solenopsis saevissima</i>	47
Tabela 3. Concentração de DNA total na solução de extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro <i>Aedes albopictus</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP: Ampicilina

AMP-R: Ampicilina resistente

CEPLAC: Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

F: Forward

FDA: Food and drug administration

IC: Incompatibilidade citoplasmática

mRNA: RNA mensageiro

NC: Nitrocelulose

PBS: Salina tamponada com fosfato

PBST: Salina tamponada com fosfato contendo tween

PCR: Reação em cadeia da polimerase

R: Reverse

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SOC: Meio SOB contendo 20% de glicose 1M

TEMED: N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamida

tRNA: RNA transportador

Walb: *Wolbachia* derivada do hospedeiro *Aedes albopictus*

Wsae: *Wolbachia* derivada do hospedeiro *Solenopsis saevissima*

WSP: *Wolbachia surface protein*

SUMÁRIO

1 Introdução	12
1.1 <i>Wolbachia</i> (α -Proteobacteria, Rickettsiales): Biologia e Sistemática.....	12
1.2 O genoma de <i>Wolbachia</i>	13
1.3 Os ‘fenótipos’ reprodutivos induzidos em hospedeiros infectados.....	14
1.4 A Proteína WSP.....	16
1.5 Hospedeiros do endossimbionte <i>Wolbachia</i>	17
1.5.a <i>Solenopsis saevissima</i>	18
1.5.b <i>Aedes albopictus</i>	18
1.6 Síntese de peptídeo recombinante.....	19
1.7 Síntese de peptídeo recombinante <i>in vitro</i> sem a utilização de cultura de células.....	20
2 Objetivos	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 Métodos	23
3.1 Amostras.....	23
3.2 Obtenção das sequência parcial do gene WSP.....	24
3.3 Obtenção da <i>E. coli</i> -competente transformada pelo vetor pEXP5-CT/TOPO®.....	27
3.4 Determinação da orientação do inserto.....	28
3.5 Extração do vetor.....	30
3.6 Sequenciamento.....	31
3.7 Análises de fotometria.....	32
3.8 Expressão da proteína recombinante.....	32
3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	34
3.10 Purificação em coluna de Níquel.....	36
4 Resultados	37
4.1 Amplificação do segmento extracelular do gene WSP em <i>Solenopsis saevissima</i> e <i>Aedes albopictus</i>	37
4.2 Clonagem da sequência WSP em bactérias competentes.....	38
4.3 Controle das colônias para o inserto. Extração do vetor.....	39
4.4 Seleção das colônias segundo a orientação do inserto.....	41
4.5 Eficiência da transformação das colônias.....	45

4.6 Análise de espectrofluorescência.....	46
4.7 Caracterização das sequências do inserto. Sequenciamento.....	47
4.8 Ensaio de expressão do peptídeo recombinante WSP.....	49
4.9 Identificação do peptídeo recombinante.....	51
5 Discussão e Conclusões.....	56
Referências.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Wolbachia* (α -Proteobacteria, Rickettsiales): Biologia e Sistemática

Wolbachia são bactérias endossimbiontes intracelulares obrigatórias (RASGON *et al.*, 2004), descritas pela primeira vez no mosquito *Culex pipiens* (Diptera; Culicidae) em 1924 pelos pesquisadores Marshall Hertig e Samuel Wolbach. Entretanto, a descrição completa do microorganismo *Wolbachia* somente foi publicada 12 anos depois (HERTIG, 1936).

Estudos indicam que aproximadamente 76% de todas as espécies de insetos estão infectados pela *Wolbachia* (JEYAPRAKASH *et al.*, 2000). Devido ao grande número de espécies infectadas pelo endossimbionte, essa bactéria é considerada a forma de vida mais amplamente distribuída do planeta (WERREN *et al.*, 1995a; TORTORA, 2003).

Esse endossimbionte infecta as células reprodutivas, e como consequência, é transmitido de uma geração a outra, através do citoplasma da célula-ovo de seus hospedeiros (DUMLER *et al.*, 2001). Estudos recentes relatam também a ocorrência de *Wolbachia* em células da glândula salivar de mosquitos hematófagos (ZOUACHE *et al.*, 2009).

Embora a transmissão de *Wolbachia* seja predominantemente vertical, há relatos de transmissão horizontal intraespecífica (O'NEILL *et al.*, 1992; WERREN *et al.*, 1995b; SCHILTHUIZEN & STOUTHAMER 1997; HEATH *et al.*, 1999) e interespecífica (VAN MEER *et al.*, 1999a; VAVRE *et al.*, 1999; HUIGENS *et al.*, 2000; NODA *et al.*, 2001; HUIGENS *et al.*, 2004).

Os efeitos sobre o comportamento reprodutivo dos artrópodes hospedeiros serão descritos adiante, contudo a diversidade desses *fenótipos* reprodutivos de *Wolbachia* motivou diversos estudos, cujos objetivos foram discriminar as relações filogenéticas entre as diferentes cepas descritas do microorganismo. Análises comparativas de sequências obtidas a partir do gene 16S rDNA, tendo o gênero *Ehrlichia* como grupo externo, fracassaram na diferenciação dos clados de acordo com os *fenótipos* reprodutivos (ROUSSET *et al.*, 1992). Entretanto, os estudos preliminares verificaram que existem apenas 3% de variação no gene 16S, entre as diferentes cepas de *Wolbachia* (O'NEILL *et al.*, 1992; STOUTHAMER *et al.*, 1993). A discreta variação fixada no gene 16S rDNA, pode ser a causa da impossibilidade de solucionar a filogenia de *Wolbachia* entre as cepas descritas, através desse loco. Outros genes

têm sido selecionados para a descrição filogenética, entre eles o gene 23S, a região espaçadora SR2, o gene ribossomal 5S, o gene *ftsZ* relacionado à regulação do ciclo celular da bactéria e a sequência "operon" *groE*, entre outros (FIALHO & STEVENS, 1995; 1997; VAN MEER *et al.*, 1999b). Embora algumas dessas sequências tenham apresentado maior nível de variação, não houve uma discriminação satisfatória das cepas de *Wolbachia*. Um significativo nível de variação foi descrito para o gene WSP, cujo produto gênico obtido constitui um peptídeo integral da membrana do microorganismo (VAN MEER *et al.* 1999c).

Através da análise comparativa de porções hipervariáveis do gene WSP, bem como da combinação deste com outros padrões de variação molecular, têm sido proposta a subdivisão do clado em ramos filogenéticos nomeados de *supergrupos* (LO *et al.*, 2002). Os primeiros *supergrupos* foram descritos a partir de insetos hospedeiros, e foram nomeados de supergrupo A e supergrupo B (WERREN *et al.*, 1995c). Um exemplo disso são as espécies do gênero *Drosophila*, as quais estão predominantemente infectadas pelo *supergrupo* A de *Wolbachia*, e frequentemente as espécies do gênero *Culex* estão infectadas por cepas do *supergrupo* B (ZHOU *et al.*, 1998). Após a identificação de *Wolbachia* em nematóides, foram propostos os *supergrupos* C e D (BANDI *et al.*, 1998). Outros quatro *supergrupos* foram descritos (E, F, G e H), sendo que o *supergrupo* E é encontrado particularmente em insetos da ordem Collembola (VANDEKERCKOVE *et al.*, 1999). O *supergrupo* F inclui hospedeiros da ordem Isoptera e nematóides do gênero *Mansonella* (LO *et al.*, 2002). Alguns aracnídeos são hospedeiros do *supergrupo* G, e o *supergrupo* H foi descrito em térmitas da ordem Isoptera (ROWLEY *et al.*, 2004; BORDENSTEIN *et al.*, 2005).

Alguns estudos têm proposto que a *Wolbachia* prevalente em diferentes espécies de nematóides, devam constituir uma espécie distinta do endossimbionte, em relação àquela encontrada entre os hospedeiros artrópodes (BROWNLIE *et al.*, 2005). Entretanto, resultados obtidos pelo banco de dados genômico, *multilocus sequence typing* (MLST) (BALDO *et al.*, 2006), no qual vários aspectos da variação intragenômica de *Wolbachia* têm sido analisados, inclusive padrões de recombinação, reafirmam a validade de espécie única para *Wolbachia*. No entanto, a partir de análises de tipagem de sequência do WSP, foi proposta a reformulação na distribuição das cepas entre os *supergrupos* (BALDO *et al.*, 2010).

1.2 O genoma de *Wolbachia*

Comparações entre espécies de bactérias de vida livre e as formas endossimbiontes evidenciaram uma redução significativa do genoma das formas endossimbiontes. Atribui-se à disponibilidade de metabólitos das células hospedeiras, como um dos fatores que podem ter reduzido a pressão seletiva sobre as muitas vias metabólicas dessas bactérias (KLASSON *et al.*, 2004; WERNEGREN 2005). O genoma completo da bactéria *E. coli* é de aproximadamente 5,5 milhões de pares de base (fonte: *GenBank*, no. de acesso: AE05174), no entanto o genoma do endossimbionte *Wolbachia* possui apenas um quinto desse tamanho, aproximadamente 1,3 milhão de pares de bases (fonte: *GenBank*, no. de acesso: AE017196).

A dependência do simbiote ao microambiente interno das células do seu hospedeiro explica a impossibilidade de manter culturas de *Wolbachia*, o que dificulta a realização de experimentos com o objetivo de obter quantidades expressivas do DNA genômico desse microorganismo (HOERAUF *et al.*, 2007). Para a obtenção do DNA genômico do endossimbionte, foi necessário o desenvolvimento de diferentes métodos que pudessem identificar a presença desse microorganismo em seus hospedeiros. Para tanto foram padronizados métodos de amplificação de sequências marcadoras do microorganismo através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Somente através dessa metodologia foi possível evidenciar de forma segura a prevalência de *Wolbachia* em um número vasto de espécies de artrópodes (WERREN *et al.*, 1995d; WEST *et al.*, 1998; WERREN *et al.*, 2000).

1.3 Os "fenótipos" reprodutivos induzidos em hospedeiros infectados

As modificações induzidas no comportamento reprodutivo de hospedeiros infectados por *Wolbachia* são comumente denominadas 'fenótipos' reprodutivos. Os simbiotes podem induzir alterações tais como a feminização de machos, partenogênese, a morte prematura dos embriões machos e a incompatibilidade citoplasmática (IC) (WERREN 1997; STOUTHAMER *et al.*, 1999).

A presença de um microorganismo citoplasmático associado com a feminização do isópodo *Armadillidium vulgare* foi inicialmente proposta em 1973 (MARTIN *et al.*). Estudos posteriores indicaram que a possibilidade do desenvolvimento de fêmeas a partir de machos genéticos, poderia ser determinado pela ação da *Wolbachia* (ROUSSET *et al.*, 1992). A feminização induzida pela *Wolbachia* foi documentada mais comumente em espécies de

isópodos terrestres, através da inibição do desenvolvimento das glândulas androgênicas nesses insetos (AZZOUNA *et al.*, 2004). Esse endossimbionte foi identificado como pertencente ao *supergrupo* B de *Wolbachia*, porém não há evidências de que o clado B esteja correlacionado ao ‘fenótipo’ da feminização nas espécies de isópodos terrestres ou em outras espécies (BOUCHON *et al.*, 1998).

A feminização tem sido considerada a estratégia mais benéfica para um microorganismo materno herdado, como a *Wolbachia*. A conversão dos machos da descendência em fêmeas infectadas aumenta a transmissão potencial de *Wolbachia* para a geração seguinte (HOERAUF & RAO 2007). No entanto, a feminização constitui um ‘fenótipo’ raro entre os ‘fenótipos’ que a *Wolbachia* induz em seus hospedeiros. Nos artrópodes, apenas duas ordens foram relatadas como "portadoras" de microorganismo indutores desse ‘fenótipo’, sendo o primeiro relato em insetos da Ordem Lepidoptera (*Ostrina scapulalis*) (KAGEYAMA *et al.*, 2002).

A partenogênese induzida pela *Wolbachia* foi descrita apenas para as espécies haplodiplóides, onde as fêmeas (diplóides) se desenvolvem a partir de ovos fertilizados e os machos (haplóides) a partir de ovos não fertilizados. A partenogênese é descrita em três Ordens de artrópodes: Hymenoptera (vespas), Thysanoptera (lacerdinhas) e Acari (ácaros) (ARAKAKI *et al.*, 2001; MORITZ 1997). Durante a indução da partenogênese em vespas do gênero *Trichogramma* e *Leptopilina* (*L. clavipes*), a anáfase de ovócitos não fertilizados é interrompida durante a primeira divisão mitótica, resultando em um núcleo diplóide (feminino) (PANNEBAKKER *et al.*, 2004; STOUTHAMER *et al.*, 1994). Entretanto, em vespas *Muscidifurax uniraptor*, a primeira divisão mitótica ocorre normalmente, resultando em dois núcleos haplóides (machos). Esses núcleos podem então ser duplicados e não se dividirem mais, há restauração da diploidia, resultando no desenvolvimento de fêmeas (GOTTLIEB *et al.*, 2002). Ainda não está claro se esses são os mecanismos de uma pré-duplicação da meiose ou da partenogênese (WEEKS *et al.*, 2001a).

A morte prematura de embriões machos induzida pela *Wolbachia* foi descrita em quatro diferentes Ordens de artrópodes, na espécie *Cordylochernes scorpioides* de pseudo-escorpiões pertencente a Ordem Pseudoscorpiones (Arachnida) (ZEH *et al.*, 2005). Na Classe Insecta, a morte prematura de machos ocorre entre os dípteros (*Drosophila bifasciata* e *Drosophila innubia*) (HURST *et al.*, 2000; DYER *et al.*, 2004), os coleópteros (*Tribolium madens* [FIALHO *et al.*, 2000] e *Adalia bipunctata* [MAJERUS *et al.*, 2000]) e os lepidópteros (*Acrea encedon* [JIGGINS *et al.*, 2000] e *O. scapulalis* [KAGEYAMA *et al.*, 2004]). Alguns autores acreditam na hipótese de que a morte prematura dos machos nada mais

é do que a tentativa mal sucedida da feminização induzida pela *Wolbachia* em seus hospedeiros (NEGRI *et al.*, 2010).

A incompatibilidade citoplasmática (IC) é um dos efeitos mais proeminentes que a *Wolbachia* impõe aos hospedeiros artrópodes, ocasionando a inviabilidade na fusão dos pró-núcleos masculino e feminino, durante o cruzamento de hospedeiros infectados por cepas diferentes (DONG *et al.*, 2006). Foram descritos dois tipos de IC induzida pela *Wolbachia*, a IC unidirecional, que ocorre quando hospedeiros machos infectados não conseguem fertilizar fêmeas da mesma espécie, porém não infectadas. E a IC bidirecional ocorre quando hospedeiros machos e fêmeas estão infectados com cepas distintas de *Wolbachia*. Esses *fenótipos* foram descritos em inúmeras Ordens de insetos e também em isópodos e ácaros (LEGRAND *et al.*, 1980; NODA, 1984; WADE & STEVES, 1985; HOFFMANN, 1988; MERÇOT *et al.*, 1995; PERROT-MINNOT *et al.*, 1996; BREEUWER, 1997).

Pelo menos oito Ordens de artrópodes foram descritas com esse ‘fenótipo’: Acari (BREEUWER *et al.*, 1996), Coleoptera (WADE *et al.*, 1985), Diptera (YEN *et al.*, 1973), Isopoda (MORET *et al.*, 2001), Lepdoptera (BROWER, 1976), Hymenoptera (REED *et al.*, 1995), Homóptera (HOSHIZAKI *et al.*, 1995) e Orthoptera (KAMODA *et al.*, 2000).

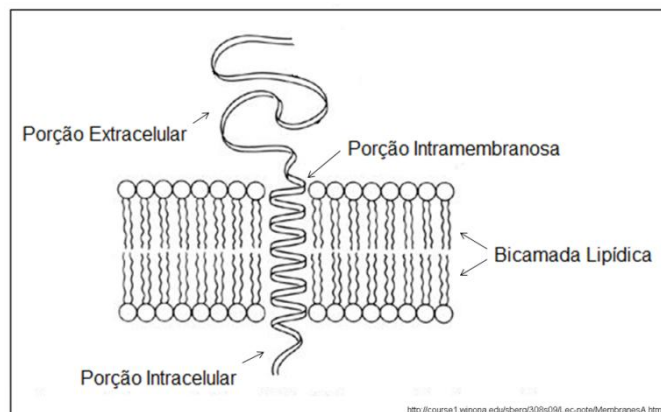


Figura 1 –Modelo molecular hipotético de uma proteína transmembrana.
Fonte: Neil A. Campbell (2008).

1.4 A Proteína WSP

Estudos têm relado que em artrópodes infectados pela *Wolbachia*, há uma elevada expressão da proteína WSP (*Wolbachia surface protein*) a partir de células do microorganismo

(BRAIG *et al.*, 1998). Devido a esse fato, há grande interesse em métodos de coloração e purificação da *Wolbachia* a partir do tecido de seu hospedeiro utilizando a proteína WSP como marcador específico (BAZZOCCHI *et al.*, 2000a). A proteína de superfície da WSP é complexa e constitui parte integrante da membrana (ver modelo molecular, Figura 1) celular do simbionte (SERBUS *et al.*, 2008).

Foi identificada primeiramente nos endossimbiontes que infectam o gênero *Drosophila spp* (BRAIG *et al.*, 1998). Esse peptídeo tem sido relatado como fator de interação entre o hospedeiro e o endossimbionte (ZHOU *et al.*, 1998; BALDO *et al.*, 2002). A partir dessa interação hospedeiro/simbionte foi demonstrado que o peptídeo WSP possui quatro regiões hipervariáveis distintas, intercaladas por sequências de aminoácidos conservadas (BALDO *et al.*, 2005). Essas regiões hipervariáveis podem ocorrer devido a eventos que envolvem a recombinação do gene da proteína com o DNA do hospedeiro, porém esses eventos de recombinação de DNA em cepas de *Wolbachia*, continuam desconhecidos (BALDO *et al.*, 2010).

As proteínas de superfície nas bactérias são frequentemente estudadas, devido à utilização desses como antígenos (RAVI *et al.*, 2009). Estudos experimentais realizados por Brattig e seus colaboradores (2004), demonstraram que a proteína WSP pode ativar a resposta imune inata em seres humanos, desencadeando uma resposta inflamatória para filaríoses humana e canina (PORKSAKORN *et al.*, 2007). Bazzocchi e seus colaboradores (2007) verificaram a presença do peptídeo *wsp* atuando na inibição da apoptose em células polimorfonucleares, tipicamente envolvidas na resposta imune inata contra microorganismos. É possível indicar que o peptídeo WSP constitui um ‘ponto-chave’ da infecção do simbionte através da inibição da apoptose (SIOZIOS *et al.*, 2008). Relatos indicam que a proteína de membrana da *Wolbachia* (WSP) derivada de hospedeiros filariais, também induziu uma resposta específica para a síntese de IgG em gatos (BAZZOCCHI *et al.*, 2000b).

1.5 Hospedeiros do endossimbionte *Wolbachia*

A seguir relatamos dois hospedeiros a partir dos quais foram selecionadas as amostras experimentais de *Wolbachia* utilizadas no presente estudo.

1.5.a *Solenopsis saevissima*

O gênero *Solenopsis*, conhecido como ‘formiga de fogo’ é nativo da América do Sul (SUAREZ *et al.*, 1999) e tem sido frequentemente estudado desde a sua introdução no sul dos Estados Unidos, onde tornou-se uma importante praga urbana (KRIEGER & KELLER, 1997). Alguns estudos mostram que em muitas espécies de formigas ocorre a infecção pela *Wolbachia* (AHRENS *et al.*, 2005; VAN BORM *et al.*, 2003). Evidências de infecção remota entre os gêneros de formigas, em comparação com outros grupos de artrópodes, têm sido relatadas (BOUWMA *et al.*, 2006). A espécie *S. saevissima* foi recentemente descrita como hospedeiro do endossimbionte (SOUZA *et al.*, 2009).

Com base na análise comparativa entre as sequências obtidas a partir do gene WSP verifica-se que diversas espécies de formigas do Novo Mundo estão infectadas pela *Wolbachia*, porém são portadoras de variantes genéticas do simbionte (TSUTSUI *et al.*, 2003).

1.5.b *Aedes albopictus*

O mosquito *Aedes albopictus* é nativo do Pacífico Sul e do sudeste da Ásia. Foi introduzido na América do Sul e nos Estados Unidos nos anos 90 (KAMBHAMPATI *et al.*, 1991a, 1991b). Wright e Barr (1980) notificaram pela primeira vez a infecção de *Wolbachia* em *Ae. albopictus*, através do estudo em mosquitos coletados na Tailândia. Esses autores relataram a presença do endossimbionte no ovário dos mosquitos. Como indicado anteriormente, através da utilização de sondas de oligonucleotídeos foi relatado pela primeira vez a presença da *Wolbachia* no citoplasma celular de lóbulos das glândulas salivares de *Ae. albopictus* (ZOUACHE *et al.*, 2009).

A múltipla infecção por diferentes *supergrupos* de *Wolbachia* em *Ae. albopictus* foi verificada em diversos estudos realizados através de homogeneizados dos mosquitos submetidos a análise em sistemas PCR (SINKIS *et al.*, 1995; ZOUACHE *et al.*, 2009). Foi relatado que a prevalência de múltipla infecção de *Wolbachia* em *Ae. albopictus* é de 96% (KITAYAPONG *et al.*, 2000; KITAYAPONG *et al.*, 2002).

Em ambos os hospedeiros, *S. saevissima* e *Ae. albopictus*, estudos têm demonstrado a

incompatibilidade citoplasmática bidirecional (KAMBHAMPATI *et al.*, 1993).

1.6 Síntese de peptídeo recombinante

Inúmeras proteínas recombinantes foram aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o uso em diversas terapias, enquanto que muitas outras encontram-se em fase de ensaios clínicos. Devido à elevada demanda para a produção de proteínas recombinantes, esforços estão sendo realizados para aumentar o rendimento e a eficiência de produção dessas proteínas (MARTÍNEZ *et al.*, 2009). Até o momento, a produção desses peptídeos depende, sobretudo de culturas de células tolerantes à transfecção e capazes de expressar de modo eficiente a sequência recombinante. Entretanto, a superexpressão de proteínas em células mantidas em culturas, geralmente resulta em um estresse nutricional nas células hospedeiras (VILLA *et al.*, 2009) o que pode limitar consideravelmente a capacidade de produção dessas células. Além disso, estudos verificaram que há um significativo aumento nas taxas de erro durante a síntese dos peptídeos (WEN *et al.*, 2009).

E. coli tem sido preferencialmente utilizada em ensaios para clonagem e expressão de peptídeos recombinantes, devido a sua simplicidade de manuseio e o baixo custo de manutenção das colônias (MAKRIDES 1996; BANEYX 1999; CASWELL *et al.*, 2009). Os peptídeos recombinantes são sintetizados através de diferentes linhagens de *E. coli* (BLOUNT *et al.*, 2008).

A utilização de *E. coli* para a superexpressão de proteínas recombinantes pode não ser indicada, devido a vários aspectos relacionados à biologia da síntese, tais como formação de corpos de oclusão, precipitados de proteínas de baixa solubilidade e a eventual toxicidade da proteína sintetizada para a bactéria (SAHDEV *et al.*, 2008). Devido a esses e outros obstáculos, novos experimentos têm procurado utilizar outros microorganismos em cultura para a síntese do peptídeo recombinante (WAGNER *et al.*, 2006). Entre as células utilizadas para a expressão de DNA recombinante são empregadas culturas de leveduras (LI *et al.*, 2004). As espécies mais utilizadas são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, devido a facilidade de manipulação e transfecção dessas células em cultura (LI *et al.*, 2007). Além disso, *S. cerevisiae* são frequentemente empregados, devido ao vasto conhecimento relativo à sua biologia e a organização molecular (ZHU *et al.*, 2009).

As culturas de células de mamíferos têm sido utilizadas devido à maior eficiência para a produção do peptídeo recombinante (MUNOZ *et al.*, 2009). Alguns estudos têm procurado selecionar diferentes linhagens de células de mamíferos, as quais podem resultar em maior fidelidade de expressão e síntese da proteína recombinante (IBBA *et al.*, 1999). Entretanto, análises observaram que durante a superexpressão de proteínas recombinantes nessas células, também há significativos erros traducionais, resultando em substituição de aminoácidos na cadeia peptídica (PUNGINELLI *et al.*, 2004). Em razão da considerável frequência de erro durante a síntese, novas técnicas estão sendo desenvolvidas para reparação (WEN *et al.* 2009).

A obtenção da proteína recombinante a partir de métodos convencionais de expressão em cultura de células, depende da utilização de diversos tipos de vetores comerciais. Durante a clonagem da sequência de interesse em microorganismos é necessária a utilização de um vetor de expressão específico (MALACINSKI 2005), muitos dos quais são exclusivos para certas linhagens celulares (HALLEZ 1995).

1.7 Síntese de peptídeo recombinante *in vitro* sem a utilização de culturas de células

Nirenberg e Matthaei (1961) desenvolveram os primeiros estudos relativos à síntese de proteínas *cell-free*. Apesar dos resultados preliminares terem sido inexpressivos em relação à síntese de peptídeos recombinantes, a técnica auxiliou na compreensão dos mecanismos evolutivos da tradução dos mRNAs em polipeptídeos funcionais (SPIRIN 2002). Avanços foram introduzidos nos protocolos experimentais e atualmente é possível obter um peptídeo recombinante similar àquele produzido em condições celulares, com as modificações pós-traducionais, bem como a inserção dos elementos protéicos em membranas lipídicas sintéticas (KATZEN *et al.*, 2008).

Esses sistemas de tradução *in vitro* baseiam-se no princípio de que a integridade celular não é necessária para a síntese de uma proteína (JERMUTUS *et al.*, 1998). Experimentos têm demonstrado que lisados celulares oriundos de qualquer organismo, são potencialmente capazes de fornecer a maquinaria sintética de tradução, enzimas e tRNA, os quais em combinação com aminoácidos e ATP resultarão na síntese de peptídeos funcionais

(SHIMIZU *et al.* 2001). Atualmente, esses sistemas foram adaptados e podem apresentar rendimentos significativos para a expressão de proteína recombinante (KLAMMT *et al.*, 2004). A facilidade do manuseio se deve ao uso de enzimas que potencializam a ação da RNA polimerase em associação com vetores de expressão, ao invés de mRNAs purificados (KIM *et al.* 2002). Devido a esses progressos, a técnica pode ser aplicada em análises proteômicas funcionais e estruturais (JACKSON *et al.* 2004).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Obtenção da porção extracelular da proteína WSP derivada do endossimbionte *Wolbachia*, através de expressão recombinante;

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a viabilidade de obtenção recombinante do marcador WSP a partir de homogeneizados brutos de hospedeiros infectados;
Seleção e clonagem em vetor da sequência WSP, marcadora do microorganismo;
- Seleção e desenvolvimento de protocolos para evidenciar a orientação correta da inserção;
- Aplicação de metodologia de expressão de peptídeo recombinante em sistema *in vitro cell-free*;
- Análise de parâmetros metodológicos relativos à eficiência do sistema *cell-free* de expressão;
- Seleção de protocolos para evidenciar a expressão do peptídeo recombinante;

3. Método

3.1 Amostras

O segmento extracelular do gene WSP marcador do endossimbionte *Wolbachia*, foi obtido a partir de diferentes insetos hospedeiros. Para tanto, foram efetuadas coletas de espécimes da formiga *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera; Formicidae) e do mosquito hematófago *Aedes albopictus* (Diptera; Culicidae). Ambos são hospedeiros naturais do endossimbionte, contudo estão infectados por cepas distintas do microorganismo (SOUZA *et al.* 2009). Os experimentos foram desenvolvidos, em sua maioria, no Laboratório de Genética Aplicada a Hospedeiros e Simbiontes – NCA/UMC.

3.1.1 Hospedeiro *Solenopsis saevissima*

As coletas de formigas *S. saevissima* foram realizadas no parque do Ibirapuera no município de São Paulo (23°35'04"S; 46°39'45"W), em Outubro de 2008. Exemplares foram obtidos a partir de dois ninhos, os quais foram mantidos em um recipiente contendo aberturas na parte superior para circulação de ar. No laboratório, os ninhos foram mantidos sob umidade, ventilação e luminosidade artificial, até o momento do uso. Exemplares (N=50) foram sacrificados em microtubo de 1,5mL contendo etanol (70%) e em seguida identificados e conservados no freezer (-20°C). Os demais exemplares foram sacrificados e descartados. A identificação taxonômica dos exemplares foi efetuada no Laboratório de Mirmecologia/NCA-UMC, por comparação com exemplares depositados pelo Prof. Dr. J.H.C. Delabie, da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira).

Quando constatada a ausência de infecção pelo endossimbionte *Wolbachia*, os espécimes foram descartados.

3.1.2 Hospedeiro *Aedes albopictus*

As amostras de mosquitos *Ae. albopictus* foram fornecidas pelo Serviço de Vigilância Epidemiológica do município de Santa Isabel/SP (23° 19' 03"S; 46° 13' 24"W), no mês de dezembro de 2008. Larvas e pupas foram coletadas através de armadilhas de oviposição, denominadas de *ovitrap*s. As formas imaturas foram mantidas em um recipiente contendo água não clorada no interior de gaiolas entomológicas. As gaiolas foram mantidas em temperatura ambiente no Laboratório de Genética Aplicada a Hospedeiros e Simbiontes NCA/UMC. Após a emergência da forma adulta, os mosquitos foram coletados com aspiradores entomológicos e sacrificados no interior de frascos de 50mL colocados em freezer (-80°C) por 10 minutos (N=50). A identificação dos animais foi realizada no próprio laboratório e após a confirmação da espécie, foram conservados em microtubo de 1,5mL contendo etanol (70%) e mantidos no freezer (-20°C) até o momento do uso.

3.2 Obtenção da sequência parcial do gene WSP

3.2.1 Extração

Os hospedeiros, formigas e mosquitos, foram macerados e homogeneizados em tampão de extração. O protocolo de extração foi adaptado a partir de Sambrook *et al.* (1989). O DNA foi ressuscitado em 30µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0), após incubação com RNase (1h à 37°C) e foi armazenado à -20°C.

Antes da reação de amplificação as amostras resultantes da extração foram examinadas em gel de agarose 1% para verificar a integridade do DNA extraído.

3.2.2 Amplificação

O gene WSP foi amplificado somente na porção correspondente ao segmento peptídico extracelular. Essa porção do gene denominada de região hipervariável equivale à 610pb (sítio 81 ao sítio 691).

A amplificação foi obtida a partir dos iniciadores 81F, (5' TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC 3') e 691R (5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA 3') (ZHOU *et al.*, 1998).

Como controle da reação de amplificação do DNA, foram utilizados Iniciadores específicos para artrópodes, o iniciador 28S rDNAF (5' CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC 3') e 28S rDNAR (5' AAG AGC CGA CAT CGA AGG ATC 3') (REUMONT *et al.*; 2009).

A reação de amplificação foi executada em 50µL de volume final, contendo 5µL da solução de extração contendo o DNA da amostra, tampão PCR contendo 50mM de MgCl₂, 10mM dNTP, 20µM de cada iniciador e 5µL da enzima *Taq*DNA polimerase (Invitrogen). O controle negativo consistiu em uma reação de amplificação não contendo o DNA da amostra, incluído em todas as reações de PCR realizadas. O programa do termociclador (ESCO - Swift Mini) foi configurado conforme tabela 1 (PCR - Obtenção do segmento).

Tabela 1 - Quadro descritivo dos programas de amplificação de diferentes sequências em sistema *Polymerase Chain Reaction*.

PCR - Obtenção do segmento	
<p>Iniciador WSP</p> <ul style="list-style-type: none"> • 691 R • 81 F/Kozak 	<p>Desnaturação 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e elongação final à 72°C por 7 minutos.</p>
<p>Iniciador T7</p> <ul style="list-style-type: none"> • Forward • Reverse 	<p>Desnaturação 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, 53°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos e elongação final à 72°C por 8 minutos.</p>

Iniciador WSP	<ul style="list-style-type: none"> • 691 R • 81 F/Kozak 	Desnaturação 94°C por 15 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e elongação final à 72°C por 15 minutos.
----------------------	---	---

Iniciador T7	<ul style="list-style-type: none"> • Forward • Reverse 	Desnaturação 94°C por 15 minutos, seguido de 25 ciclos de 95°C por 45 segundos, 53°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos e elongação final à 72°C por 5 minutos.
---------------------	--	--

PCR - Determinação da orientação da ligação do gene no vetor

Iniciadores	<ul style="list-style-type: none"> • 691 R • T7 F 	Desnaturação 94°C por 15 minutos, seguido de 25 ciclos de 95°C por 45 segundos, 53°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos e elongação final à 72°C por 5 minutos.
--------------------	---	--

Iniciadores	<ul style="list-style-type: none"> • T7 R • 81 F/Kozak 	Desnaturação 94°C por 15 minutos, seguido de 25 ciclos de 95°C por 45 segundos, 53°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos e elongação final à 72°C por 5 minutos.
--------------------	--	--

PCR – Sequenciamento

Iniciadores	<ul style="list-style-type: none"> • 691 R • T7 F • 81 F/Kozak 	Desnaturação 96°C por 1 minutos, seguido de 30 ciclos de 96°C por 20 segundos, 52°C por 20 segundos, 60°C por 4 minutos.
--------------------	---	--

3.2.3 Adição do segmento *Kozak* e do sítio de iniciação de transcrição

Quando a amplificação objetivou os experimentos relativos à expressão do segmento

peptídico, um novo iniciador '81F' foi desenhado e nele foi acrescentado o segmento de *Kozak* (KOZAK, 1978; KOZAK, 2002), o qual inclui o códon de iniciação. A sequência iniciadora 81F/Kozak foi então utilizada para a amplificação (5' GCC ACC ATG G TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC 3').

3.3 Obtenção de *E. coli*-competente transformada pelo vetor pEXP5-CT/TOPO®

3.3.1 Ligação

Foram adicionados 4µL do produto da PCR, 1µL de solução salina (1,2M NaCl, 0,06M MgCl₂) e 1µL do vetor pEXP5-CT/TOPO®(Invitrogen). O homogeneizado permaneceu por 5 minutos em repouso, em temperatura ambiente. A solução, contendo o vetor e o inserto, foi armazenada em freezer a -20°C.

3.3.2 Transformação

Em microtubos de 1,5mL foram adicionados 6µL do produto da reação de ligação e 50µL de bactérias competentes (TOP10 - Invitrogen). O homogeneizado foi incubado no gelo por 30 minutos e em seguida foi colocado por 1 minuto em termobloco a 42°C e após o choque térmico voltou ao gelo. Foi então adicionado 250µL do meio de cultura SOC (fornecido pelo kit - Invitrogen) e transferido para o termobloco com temperatura de 37°C e agitação de 350rpm por uma hora. Enquanto isso, placas de Petri contendo o meio de cultura LB-Agar/AMP foram secas em estufa por 30 minutos. Após uma hora, as bactérias foram semeadas.

3.3.3 Plaqueamento

Foram diluídos 9,6g de meio de cultura LB Agar (Invitrogen) em 300mL de água Milli-Q e o homogeneizado foi autoclavado. No homogeneizado autoclavado foram adicionados 200 μ L de ampicilina (200mg/mL) (GIBCO). Em placas de Petri foram adicionados os meios de cultura LB-Agar/AMP e as placas ficaram expostas a luz UV por uma hora.

Foram semeados 50 μ L da reação de transformação em placas de Petri contendo meio de cultura LB Agar/AMP e espalhados com pérolas de vidro. O crescimento das colônias ocorreu em estufa bacteriana a 37°C por 18 horas.

3.3.4 Seleção das Colônias

Foram selecionadas 30 colônias de cada placa e submetidas a duas etapas:

- Semeadas em placas de Petri numerada

As colônias selecionadas foram semeadas em placa de Petri contendo meio de cultura LB-Agar/AMP, previamente numeradas e em seguida, colocadas na estufa durante 18 horas a 37°C.

- Amplificação do inserto a partir das colônias

As colônias selecionadas e semeadas em placas numeradas foram submetidas à reação de amplificação, através da combinação de iniciadores específicos para o vetor e para o inserto (Tabela 1 - PCR - Colônia).

3.4. Determinação da orientação do inserto

Para a determinação da orientação do inserto no vetor, a partir da reação em cadeia da polimerase utilizando o programa do termociclador (ESCO - Swift Mini) configurado de acordo com a tabela 1 (PCR - Determinação da orientação), foram utilizados os iniciadores para o segmento WSP e para o vetor.

A confirmação da orientação foi possível através da análise do produto amplificado. De acordo com a obtenção de um produto na reação de amplificação e do tamanho do

segmento amplificado, foi possível determinar a orientação do inserto. A figura 2 ilustra os possíveis produtos amplificados nas reações de amplificação de acordo com as hipóteses de inserção do inserto e da orientação de inserção. A amplificação do fragmento de gene WSP, a partir do sítio 81 até o sítio 691, incluída a adição do segmento de *Kozak*, totalizam 620pb. Desse modo o produto amplificado esperado foi ilustrado na figura 2A.

A hipótese de amplificação do vetor pEXP5-CT/TOPO sem o inserto, utilizando os iniciadores T7F (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e T7R (5'-ATCCGGATATAGTTCCTCCTTTC-3') está ilustrada na figura 2B, cujo produto esperado é de aproximadamente 230pb. Assim a amplificação do vetor pEXP5-CT/TOPO contendo o inserto gene WSP associado ao *Kozak* deverá totalizar 850pb, conforme apresentado na figura 2C.

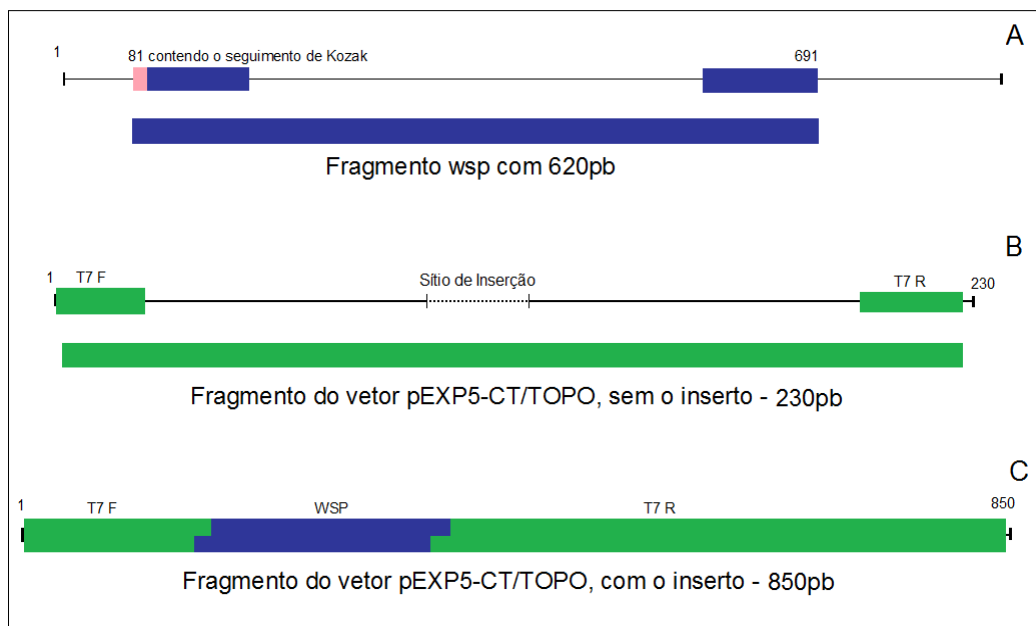


Figura 2 – Representação de reações de amplificação. A - fragmento do gene *wsp* com 620pb; B - fragmento do vetor pEXP5-CT/TOPO sem o inserto com 230pb; C - fragmento do vetor pEXP5-CT/TOPO ligado ao fragmento do gene *wsp*, com 850pb.

A figura 3 ilustra os possíveis resultados da reação de amplificação utilizando conjuntos de iniciadores para a confirmação da orientação do inserto no vetor pEXP5-CT/TOPO. A ilustração da amplificação utilizando os iniciadores T7F e 691R em conjunto, deverá resultar em um produto de aproximadamente 700pb (Figura 3A). A amplificação através do conjunto de iniciadores T7R e 81F/Kozak, totalizará um segmento de 769pb, (Figura 3B).

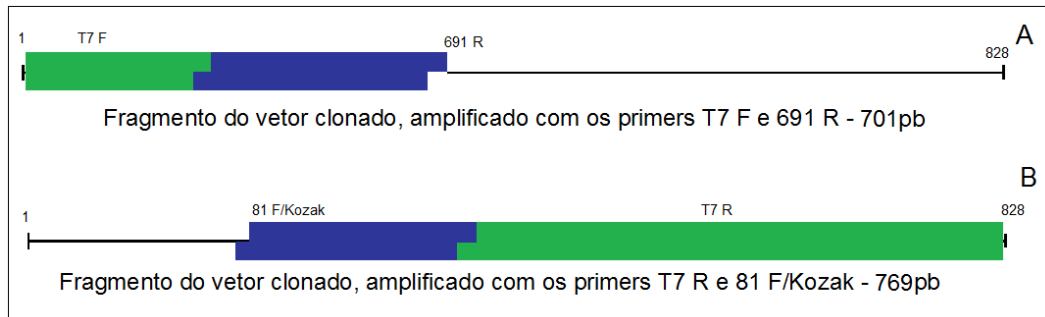


Figura 3 – Representação da combinação de iniciadores na reação de amplificação. A - fragmento do vetor clonado, amplificado com a combinação de iniciadores T7 F e 691 R com 701pb; B - fragmento do vetor clonado, amplificado com a combinação de iniciadores T7 R e 81 F/Kozak com 769pb.

3.5 Extração do vetor

As colônias positivas, cuja (i) inserção foi positiva e a (ii) orientação do inserto foi correta, foram selecionadas a partir das placas numeradas. As colônias selecionadas foram mantidas em 5mL de meio LB líquido (Invitrogen) acrescido de AMP (200mg/mL) a 37°C, sob agitação de 350rpm por 12 horas. Em seguida, as bactérias foram separadas em microtubos de 1,5mL e centrifugadas a 10.000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em 100µL da Solução A (0,05mM Glicose; 1M TrisHCl pH 8,0; 0,5M EDTA; 0,2mg RNase), depois de homogeneizado, foi adicionado 200µL da Solução B (20% SDS; 10N NaOH) e homogeneizado por inversão. Imediatamente foi adicionado 200µL da Solução C (3M Acetato de potássio; 5M ácido acético) e homogeneizado por inversão. Após permanecer em repouso no gelo por 30 minutos, foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos à 10°C. Foram transferidos 400µL do sobrenadante para novo microtubo de volume 1,5mL e adicionado 30µL de isopropanol (PA). O homogeneizado foi novamente centrifugado durante 5 minutos a 13.000 rpm a 10°C. O sobrenadante foi então descartado e adicionado ao precipitado 500µL de etanol (70%) gelado, e homogeneizado por inversão. Após centrifugar por 7 minutos a 4°C e 13.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado com 20µL de água Milli-Q autoclavada (SAMBROOK *et al.*, 1989). O produto foi armazenado no freezer a -20°C até o momento do uso.

3.6 Sequenciamento

3.6.1 Purificação

Para a purificação do produto da extração do vetor foi utilizado o *kit* de Purificação *QIAquick[®] PCR* (Quiagen).

Em microtubo de 1,5mL foram adicionados 20µL do produto de reação da extração do vetor e em seguida adicionado cinco vezes desse volume, o tampão PB, fornecido pelo *kit* e em seguida homogeneizado. A coluna (*QIAquick*) foi colocada em um microtubo de 2 mL e o homogeneizado foi adicionado à coluna e centrifugado por um minuto à 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado à coluna 750µL do tampão PE fornecido pelo *kit*. Centrifugou-se novamente por um minuto à 13.000rpm e novamente o sobrenadante foi descartado. A coluna foi centrifugada, nas mesmas condições, no interior de um microtubo de 1,5mL.

Para a eluição do DNA foram adicionados no centro da coluna 20µL do tampão EB (10mM Tris HCl, pH 8.5) e em seguida centrifugado à 13.000 rpm por um minuto.

O produto da purificação foi armazenado no freezer à -20°C até o momento do uso.

3.6.2 Reação

Em um microtubo de 0,2mL foram adicionados 2µL do produto da purificação, 3µL de tampão *Save Money*, 2µL de *Big Dye* (Applied Biosystem), 1µL do iniciador 691R (5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA 3'), 1µL do iniciador T7F (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') e 2µL de água Milli-Q autoclavada. Para confirmação da inserção do segmento de Kozak, foi utilizado somente o iniciador 81F/Kozak (5' GCC ACC ATG G TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC). O homogeneizado foi submetido ao programa de sequenciamento no termociclador, segundo os parâmetros descritos na tabela 1 (PCR - Sequenciamento).

3.6.3 Precipitação

O produto da reação de sequenciamento foi transferido para um microtubo de 1,5mL contendo 80 μ L de isopropanol 75% e deixado em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos à 3000rcf e o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao precipitado 200 μ L de etanol 70% e submetido a centrifugação por 2 minutos à 3000rcf. O sobrenadante foi descartado e as reações foram secas em evaporador centrífugo (Speed Vac) por 15 minutos.

As amostras foram submetidas ao sequenciador ABI PRISM - 3100 Analyzer, no Laboratório de Genômica Estrutural - NIB/UMC.

3.7 Análises de Fotometria

Após a extração do vetor, as amostras foram submetidas à análises de fotometria ($\lambda=260/280$), no espectrofotômetro (NanoDrop3300) para quantificação do DNA em ng/ μ L no Laboratório de Genômica Estrutural - NIB/UMC.

3.8 Expressão da proteína recombinante

3.8.1 *Expressway Cell-Free E. coli Expression System*

O *Expressway Cell-Free E. coli Expression System* (Invitrogen) foi desenvolvido para a transcrição e tradução do DNA-alvo para proteína em uma única reação *in vitro*.

Esse sistema utiliza um extrato otimizado de *E. coli*, em tampão de reação contendo um sistema de regeneração do ATP e aminoácidos que permitem a síntese da proteína recombinante de interesse aumentando a estabilidade do DNA durante a transcrição e tradução. Esse sistema contém a enzima RNA polimerase, a qual reconhece o promotor T7 do

vetor, e outros componentes otimizados para a melhor expressão do DNA-alvo.

Após o início da reação de síntese, é adicionado um tampão complemento contendo uma mistura de sais, aminoácidos e outros substratos que podem ser esgotados ou degradados durante a reação de síntese do peptídeo recombinante. A adição desse tampão permite a continuação da síntese da proteína recombinante em um sistema *cell-free* durante no máximo 6 horas.

3.8.2 Utilização do Kit

As amostras selecionadas para o ensaio de expressão do peptídeo foram aquelas que apresentaram maior concentração do vetor contendo o inserto. Para uma concentração mínima de 500ng/ μ L foram adicionados 20 μ L de extrato de *E. coli*, 20 μ L de tampão de reação, fornecido com o *kit*, 1,25 μ L de aminoácidos, 1 μ L de metionina, 1 μ L de enzima T7 *mix*, fornecido com o *kit*, e o volume final de 50 μ L foi ajustado com água Milli-Q autoclavada em microtubos de 1,5mL. A solução foi incubada por 30 minutos à 35°C e sob agitação de 300rpm.

Enquanto isso, foi preparada a reação do tampão complemento contendo 25 μ L de tampão complemento fornecido com o *kit*, 1,25 μ L de aminoácidos, 1 μ L de metionina e o volume final de 50 μ L foi ajustado com água Milli-Q autoclavada. Após os 30 minutos de incubação, o tampão complemento foi adicionado aos tubos contendo as amostras e, permaneceu por 6 horas no termobloco à 35°C e sob agitação de 300rpm.

3.8.3 Precipitação do peptídeo

Para verificação da síntese do peptídeo foram adicionados em 5 μ L das amostras 20 μ L de acetona, e em seguida foram homogeneizadas e centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o precipitado foi ressuscitado em 20 μ L de tampão 1X SDS-PAGE (Tris HCl 0,5M, pH 6.8; Glicerol, β -mercaptoetanol; Azul de bromofenol e SDS). O mesmo foi incubado a 75°C no termobloco por 15 minutos e estocado

em refrigerador à -20°C.

3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Um volume de 10µL de cada uma das amostras precipitadas foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), conforme método descrito por Laemmli (1970). Para este experimento foi utilizado o tampão de corrida Tris-Glicina (0,125M, pH 8,2). As condições de corrida foram 10mA iniciais, até as amostras passarem do gel de empacotamento e 20mA até o final.

3.9.1 Preparação do gel

O gel de corrida foi preparado a partir de uma solução acrilamida e bis-acrilamida (12,5%) em tampão Tris-HCl (0,375M, pH 8,8) e dodecil sulfato de sódio (SDS - 1%). Foi acrescentada uma solução de persulfato de amônio (10%) e TEMED (PA). O gel de empacotamento foi preparado a partir de uma solução acrilamida e bis-acrilamida (5%) e utilizado o tampão Tris HCl (0,275M, pH 6,8).

3.9.2 Revelação do homogeneizado peptídico

3.9.2.1 Coloração por Coomassie Blue

Após a corrida, o gel permaneceu por 10 minutos em solução fixadora (etanol 25% e ácido acético 10%) em agitação leve e em seguida foi lavado por duas vezes com água Milli-Q. Após a lavagem o gel ficou imerso em solução corante (2g de *coomassie blue*, ácido acético 25% e etanol 10%) por uma hora e depois descorado com água Milli-Q até a

visualização das bandas.

3.9.2.2 Fluorescência

Para a confirmação da síntese do peptídeo recombinante foi utilizado o sistema *InVisionTM His-tag* (Invitrogen), um corante que fluoresce na presença de resíduos de histidina. O experimento foi realizado no Laboratório de Animais Transgênicos/UNIFESP.

Logo após a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi fixado por uma hora em solução fixadora (etanol 30%, ácido acético 6% e Milli-Q). Logo em seguida o mesmo foi lavado por 10 minutos em água Milli-Q e permaneceu submerso em solução *InVision His-tag In-gel Stain* por 12 horas protegido de luz. Após 12 horas, o gel foi lavado com solução de 20mM de fosfato pH 7.8 até a visualização máxima das bandas.

3.9.2.3 Ensaio imunorradiográfico em sistema Western Blot

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada a transferência do peptídeo para membrana de nitrocelulose (Hybond - ECL Nitrocellulose Membrane[®] - Amershan Bioscience), à 20mA por 3 horas em cuba de transferência, utilizando tampão de transferência (0,025M Tris, glicina 1,44% em etanol 20% gelado). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com a solução de bloqueio (Tween 20 - 0,05%, leite em pó desnatado - Molico[®] - 5% em PBS (35mM fosfato de sódio; 150mM NaCl) por uma hora sob agitação constante. Em seguida a membrana foi submetida a solução de lavagem PBST (tampão PBS acrescido de 0,3% Tween-20) 3 vezes por 5 minutos sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com 10 mL do anticorpo primário Monoclonal Anti-poli-histidina produzido em camundongo (Sigma) na diluição 1:2000. A incubação primária foi realizada por 3 horas sob agitação orbital leve em temperatura ambiente. A membrana foi lavada em tampão PBS três vezes. Após a lavagem, a membrana foi incubada em solução contendo 10 mL do anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo, conjugado com a enzima peroxidase produzido em cabra (Sigma) na diluição 1:2000. A incubação secundária foi realizada por duas horas sob agitação orbital leve em temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada quatro

vezes em tampão PBS por 15 minutos. O experimento foi realizado no Laboratório de Animais Transgênicos/UNIFESP.

Para a revelação, utilizamos o *Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit*, e a emissão de luz foi detectada em filme radiográfico (Amersham Hyperfilm™ ECL – High Performance Chemiluminescent Film - GE Healthcare – Amersham). Para cada membrana foram preparados 2mL de solução reveladora (1mL da solução A e 1mL da solução B - ambas fornecidas pelo *kit*). A membrana foi incubada com essa solução por 3 minutos protegida de luz. Em sala escura, a membrana foi exposta ao filme radiográfico (Amersham) por 5 segundos e o mesmo foi submetido a tampão revelador, fornecido pelo *kit*, por 5 minutos e em seguida o filme foi lavado com água Milli-Q. Após a lavagem, o filme foi incubado em tampão fixador, fornecido pelo *kit*, por 5 minutos e em seguida lavado com água Milli-Q. Todos os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio. O experimento foi realizado no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - DMIP/UNIFESP.

3.10 Purificação em coluna de Níquel

A purificação do peptídeo foi realizada através de cromatografia por afinidade em coluna de Níquel (Ni-NTA) no Laboratório de Biofísica no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O extrato total de peptídeo expresso foi centrifugado por 5 minutos à 10.000rpm e o sobrenadante transferido para a coluna contendo a resina Protino® Ni-TED (Macherey-Nagel) A coluna foi anteriormente lavada e equilibrada com o tampão LEW (0,1M de NaH₂PO₄; 0,01M de NaCl - pH 8,0) e para a eluição do peptídeo foi aplicado 100mM de imidazol. Foram coletadas alíquotas nas quais procuramos evidenciar o peptídeo *wsp* através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%.

4. RESULTADOS

4.1 Amplificação da porção hipervariável do gene WSP em *Solenopsis saevissima* e *Aedes albopictus*

O DNA total extraído a partir de exemplares dos insetos hospedeiros foi amplificado em sistema PCR para a sequência extracelular do gene WSP. Como controle da reação de amplificação, foi simultaneamente amplificado um segmento marcador do genoma artrópode, o gene 28S rDNA.

Um segmento amplificado de aproximadamente 620pb, conforme esperado, foi obtido. A amplificação do segmento *wsp* confirmou a infecção daqueles exemplares pelo endossimbionte *Wolbachia*.

Os resultados dessas amplificações são apresentados na figura 4. Nas figuras 4A e 4B as sequências amplificadas a partir dos genes WSP, obtidos dos hospedeiros *S. saevissima* e *Ae. albopictus* respectivamente, são comparados ao marcador 28S rDNA. Nas figuras 4C e 4D observa-se a prevalência da infecção nos hospedeiros *S. saevissima* e *Ae. albopictus*.

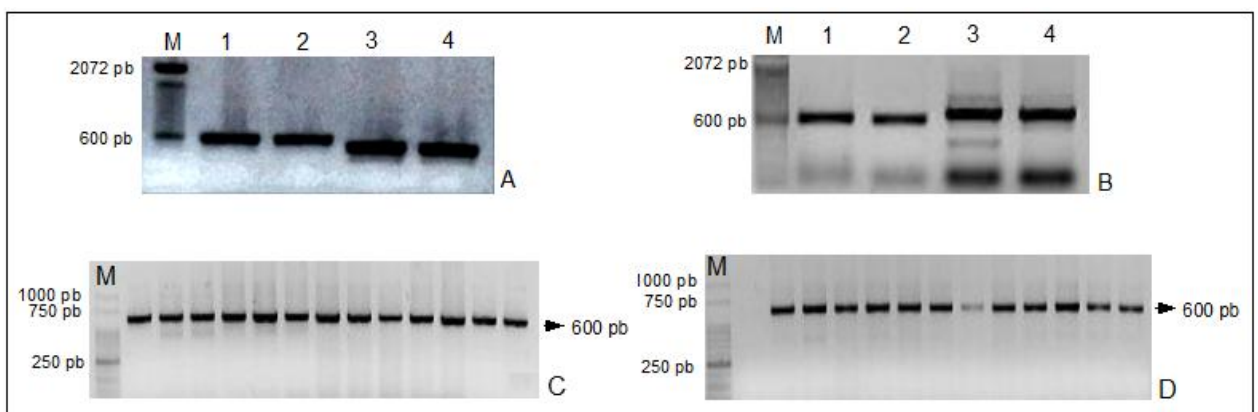


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1%. A - 1 e 2 - produtos de ampliação da sequência WSP em hospedeiro *Solenopsis saevissima*; 3 e 4 - produtos de ampliação do gene 28S rDNA em *S. saevissima*; M - marcador molecular 100pb (Invitrogen); B: 1 e 2 - produto de amplificação da sequência *wsp* em hospedeiro *Aedes albopictus* ; 3 e 4 - amplificação do gene 28S rDNA em *Ae. albopictus*; M - marcador molecular 100pb (Invitrogen); C - Produto de amplificação da sequência WSP em hospedeiro *S. saevissima*; M - marcador molecular 50pb (Ludwig); D - produto de amplificação da sequência WSP em hospedeiro *Ae. albopictus*; M - marcador molecular 50pb (Ludwig).

As sequências WSP obtidas a partir dos diferentes hospedeiros invertebrados foram amplificadas e aplicadas simultaneamente no mesmo gel (figura 5). É possível verificar que

existe discreta diferença no tamanho das sequências do segmento amplificado, obtidas a partir de diferentes hospedeiros.

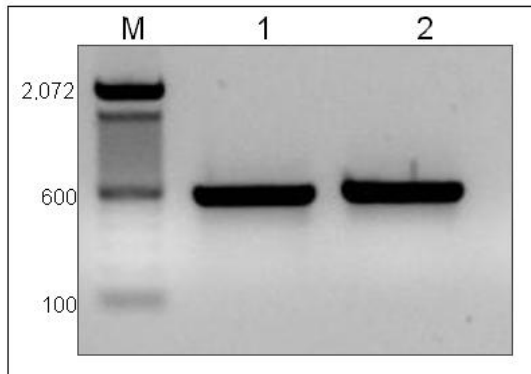


Figura 5 - Comparação da sequência WSP obtida a partir de diferentes hospedeiros. 1 - produto de amplificação da sequência WSP em *Solenopsis saevissima*; 2 - produto de amplificação da sequência WSP em *Aedes albopictus*; M - marcador molecular de 100pb (Invitrogen). Gel de agarose 1%.

4.2 Clonagem da sequência *wsp* em bactérias competentes

A partir dos resultados positivos das amplificações das sequências *wsp*, os produtos das reações de amplificação foram ligados ao vetor pEXP5-CT/TOPO[®] (Invitrogen) e em seguida clonados em *E. coli* Top 10. Após o crescimento das colônias em meio líquido (SOC), as células foram semeadas e as colônias ampicilina-resistente (AMP-R) foram selecionadas, as quais são indicadoras do resultado positivo da inserção do vetor (figura 6 - A e B).

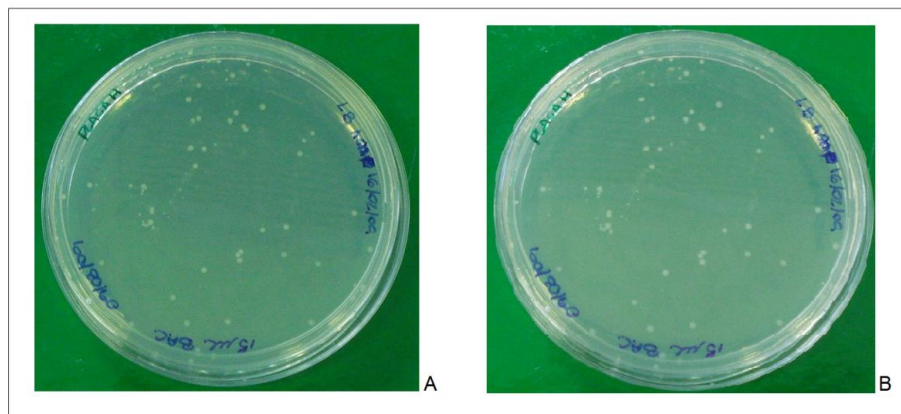


Figura 6 - Colônias das bactérias transformadas (ampicilina-resistente) e semeadas em placas com LB-Agar/AMP contendo o inserto *wsp* derivado de diferentes insetos hospedeiros. A - *Aedes albopictus*; B - *Solenopsis saevissima*.

As colônias positivas foram selecionadas e transferidas para uma nova placa de Petri, previamente numerada, contendo o meio LB-Agar/AMP (figura 7). Esse procedimento foi necessário para que as análises seguintes, sobretudo relativas a orientação do inserto pudessem identificar as colônias de interesse.

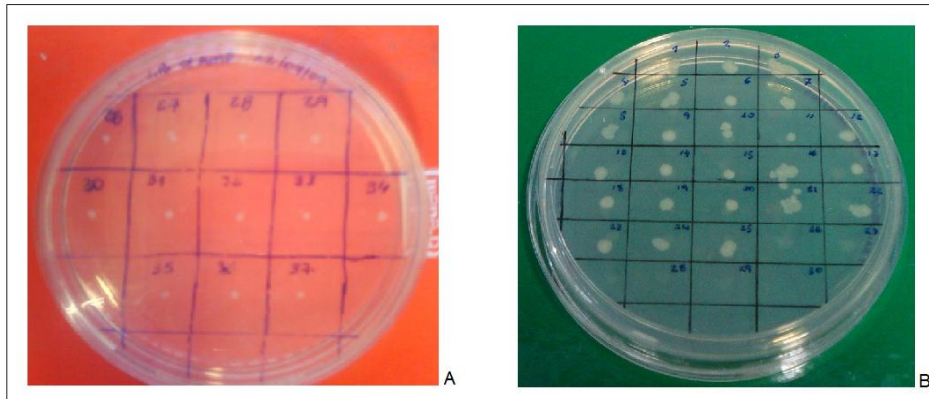


Figura 7 - Identificação das colônias de bactérias transformadas em placa de Petri previamente numerada contendo o inserto WSP derivado de diferentes insetos hospedeiros. A - *Aedes albopictus*; B - *Solenopsis saevissima*.

4.3 Controle das colônias transformadas para o inserto. Extração do vetor.

Com o objetivo de verificar a presença do inserto nas colônias transformadas pelo vetor, procedemos a amplificação do vetor a partir de colônias previamente identificadas (figura 7), utilizando os iniciadores do vetor pEXP5-CT/TOPO[®] (T7 - F e R) e em seguida as colônias foram analisadas através dos iniciadores para a sequência do gene WSP. Através desse procedimento pudemos confirmar a inserção do vetor e a presença do inserto no vetor.

4.3.1 Frequência do inserto WSP derivado do hospedeiro *S. saevissima*

Os resultados das amplificações dos vetores contendo o inserto derivado do hospedeiro *S. saevissima*, a partir do uso dos iniciadores do vetor são apresentados na figura

8A. É possível verificar nessa figura que as colônias 1, 2, 3, 4, 6, e 7 nas posições 1, 2, 3, 4, 6 e 7 respectivamente, foram transformadas pelo vetor e possuem o inserto. A presença deste último foi inicialmente deduzida em razão do tamanho do segmento amplificado (ver figura 2C do Material e Métodos). Entretanto, as colônias 5 e 8, nas posições 5 e 8 do gel, foram transformadas pelo vetor, contudo não possuem o inserto. É possível verificar nas colônias positivas para o inserto a presença de uma segunda banda, de aproximadamente 250pb, o que pode indicar que mais de um vetor possa ter sido introduzido na célula. Vetores não contendo o inserto possuem maior probabilidade de serem introduzidos nas células de *E. coli* do que aqueles contendo o inserto.

As colônias selecionadas contendo o vetor e o inserto derivado do hospedeiro *S. saevissima*, foram novamente amplificadas, contudo neste experimento foram utilizados os iniciadores específicos para o gene WSP. O objetivo deste experimento foi confirmar a presença do inserto WSP, o que foi verificado através do padrão de amplificação (figura 8B). As colônias 1, 2, 3, 4, 6 e 7 nas posições 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do gel indicam a presença da sequência WSP inserida no vetor derivado do hospedeiro *S. saevissima*.

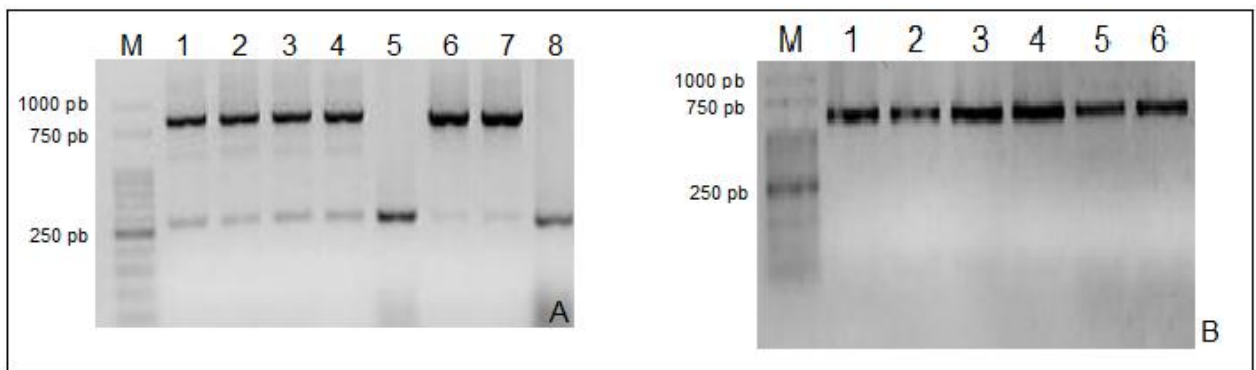


Figura 8 - Produto de amplificação a partir de colônias ensaiadas para transformação com vetor pEXP5-CT/TOPO[®] contendo o inserto derivado do hospedeiro *Solenopsis saevissima*. A - produto de amplificação utilizando os iniciadores do vetor sendo 1 a 4, 6 e 7 amostras positivas para a ligação do gene WSP ao vetor e 5 e 8 amostras negativas para a ligação do gene WSP ao vetor; B - produto de amplificação utilizando os iniciadores específicos para o gene WSP. M - Marcador molecular de 50pb (Ludwig).

4.3.2. Frequência do inserto WSP derivado do hospedeiro *Ae. albopictus*

Os resultados das amplificações dos vetores contendo o inserto derivado do hospedeiro *Ae. albopictus*, através dos iniciadores do vetor são apresentados na figura 9A. É

possível verificar na figura 9A que as colônias 43, 48 e 49, nas posições 3, 8 e 9 respectivamente, foram transformadas pelo vetor e possuem o inserto. Do mesmo modo que no experimento anterior, a presença deste último foi inicialmente deduzida em razão do tamanho do segmento amplificado (ver figura 2C do Material e Métodos). Entretanto, as colônias 41, 42, 44, 45, 46 e 47, nas posições 1, 2, 4, 5, 6 e 7 respectivamente, foram transformadas pelo vetor, contudo não possuíam o inserto.

As colônias selecionadas contendo o vetor e o inserto derivado do hospedeiro *Ae. albopictus*, foram também amplificadas utilizando os iniciadores específicos para o gene WSP, e a presença do inserto foi novamente confirmada (figura 9B). As colônias 43, 48 e 49, nas posições 1, 2 e 3 do gel indicam a presença do segmento WSP inserido no vetor derivado do hospedeiro *Ae. albopictus*.

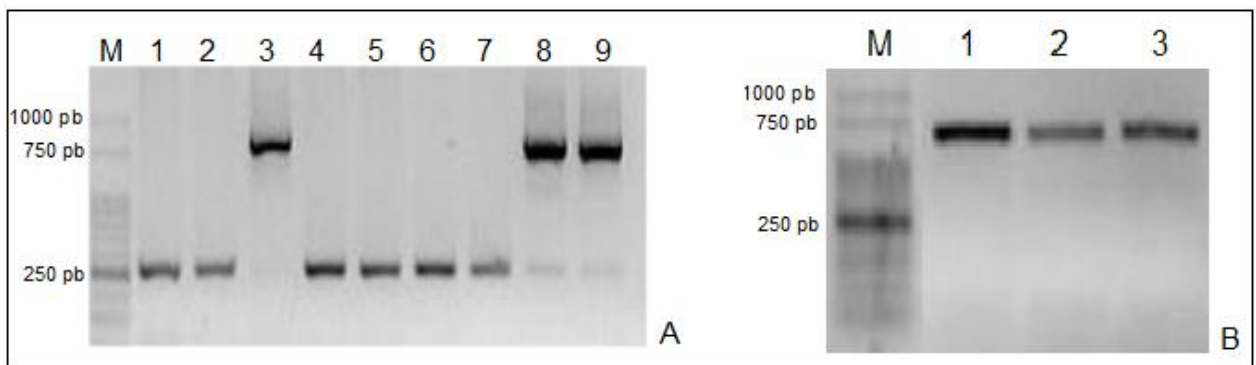


Figura 9 - Produto de amplificação a partir de colônias ensaiadas para transformação com vetor pEXP5-CT/TOPO[®] contendo o inserto derivado do hospedeiro *Aedes albopictus*. O vetor sem o inserto tem 230pb enquanto que o vetor ligado ao fragmento do gene WSP tem 850pb. A - produto de amplificação utilizando os iniciadores do vetor sendo 3, 8 e 9 amostras positivas para a ligação do gene WSP ao vetor e 1, 2, 4 ao 7 amostras negativas para a ligação do gene WSP ao vetor; B - produto de amplificação utilizando os iniciadores específicos para o gene WSP. M - Marcador molecular de 50pb (Ludwig).

4.4 Seleção das colônias segundo a orientação do inserto

As colônias positivas para a presença do inserto foram mantidas em meio de cultura LB-líquido contendo ampicilina e posteriormente foram submetidas a extração do vetor. Para a confirmação da orientação do inserto, os vetores foram extraídos e amplificados através de diferentes combinações entre os *iniciadores* do gene WSP e os iniciadores do vetor (T7 R e F). A identificação da orientação foi possível devido ao tamanho do produto amplificado, conforme o previsto para cada hipótese de anelamento dos iniciadores e inserção do segmento

do gene WSP (ver figura 3, Material e Métodos).

4.4.1 Análise do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *S. saevissima*

Os resultados da amplificação do produto da extração do vetor contendo a sequência WSP de *Wolbachia* obtida de hospedeiros *S. saevissima* são apresentados para cada colônia examinada (figura 10). Através da combinação dos iniciadores T7 F e 691 R todas as colônias selecionadas foram amplificadas. Para aquelas colônias, cujo inserto foi corretamente inserido, esperávamos a obtenção de produtos amplificados de aproximadamente 700pb. Entretanto, nas colônias cuja inserção foi incorreta, não há amplificação de sequência, devido a incompatibilidade de orientação de iniciadores e da ação polimerase específica da enzima *Taq*. Portanto, as colônias 2, 3, 4 e 6, nas posições equivalentes na figura 10A, indicam a correta orientação do inserto. Esses resultados foram confirmados através da combinação dos iniciadores T7 R e 81 F/Kozak na figura 10B, cujo produto de amplificação esperado é de 770pb.

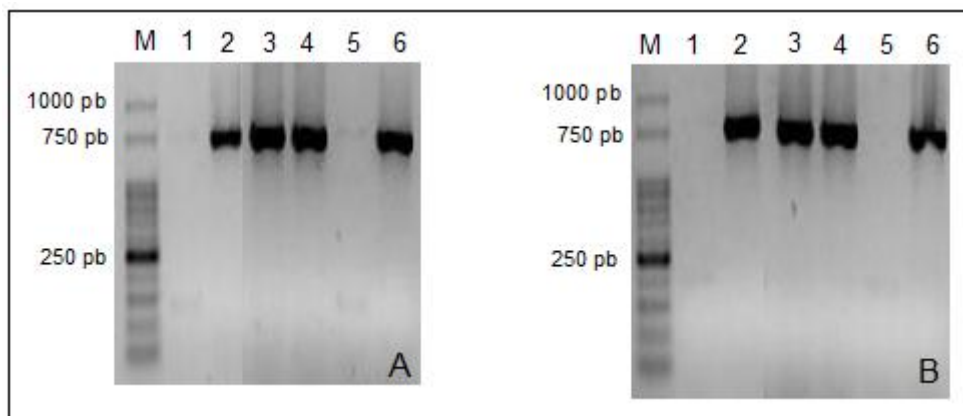


Figura 10 - Amplificação do produto da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Solenopsis saevissima*. A -utilizando os iniciadores T7 F e 691 R; B - utilizando os iniciadores T7 R e 81 F/Kozak; M - marcador molecular de 50pb (Ludwig).

4.4.2 Análise do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Ae. albopictus*.

A figura 11 apresenta os resultados da amplificação do produto da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Ae. albopictus*. Conforme justificado acima, foi possível deduzir que as colônias 43 e 48, nas posições 1 e 2 do gel respectivamente, amplificadas a partir da combinação de iniciadores T7 F e 691 R, não apresentaram a inserção correta da sequência WSP de *Wolbachia* derivado do mosquito *Ae. albopictus*. Somente a colônia 49 na posição 3 do gel apresentou a correta orientação do inserto. A seguir as amostras foram novamente amplificadas, contudo foram utilizadas a combinação de iniciadores T7 R e 81 F/Kozak. Através desse novo experimento foi confirmado a correta orientação do inserto na colônia 49, posição 6 do mesmo gel, tendo sido obtido um produto de amplificação de aproximadamente 770pb (figura 11).

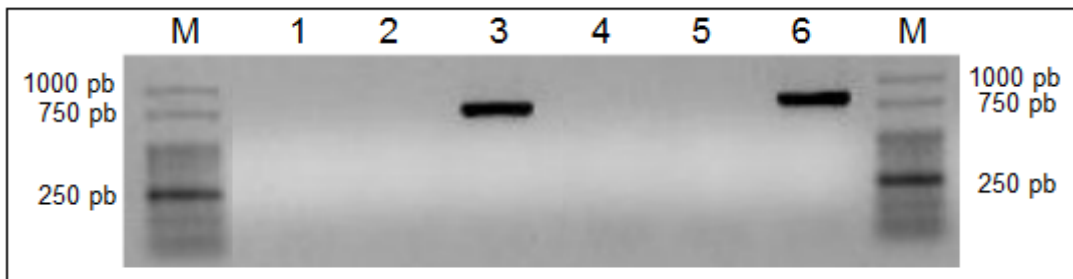


Figura 11 - Amplificação do produto da extração de vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Aedes albopictus*. 1 ao 3 - utilizando os iniciadores T7 F e 691 R; 4 ao 6 - Utilizando os iniciadores T7 R e 81 F/Kozak; M - Marcador molecular 50pb (Ludwig). Gel de agarose 1%.

Todos os resultados referentes à combinação dos iniciadores com o objetivo de identificação dos vetores contendo o inserto em orientação correta, foram reunidos em único gel (figura 12 e 13).

Os resultados das amplificações do produto da extração do vetor, contendo o inserto derivado do hospedeiro *S. saevissima*, foi realizado através da combinação dos iniciadores T7 F e R, e 81F e 691R (Figura 12). Ensaio utilizando os iniciadores T7 F e 691 R em conjunto indicaram que a colônia 10, posição 2 do gel, corresponde ao vetor com a correta inserção da sequência. Entretanto, a colônia 9, posição 1, devido a ausência de produto de amplificação, indicou que a sequência está invertida no vetor. As mesmas colônias, 9 e 10 foram novamente submetidas a amplificação, posições 3 e 4 do gel (figura 12), desta vez através da combinação de iniciadores T7 R e 81 F/Kozak. Os resultados confirmaram o padrão anteriormente descrito de inserção da sequência *wsp* no vetor. As colônias também foram amplificadas com os iniciadores do vetor (T7F e R), posições 5 e 6 do gel (figura 12). A

colônia 10 apresentou o produto de amplificação, o que indica a presença do vetor nessa colônia e o tamanho do produto amplificado está de acordo com a indicação de presença do inserto (Figura 12, posição no gel 6). A colônia 9, posição 5, não gerou qualquer produto de amplificação, possivelmente devido a falha experimental. Todavia, o vetor derivado dessa mesma colônia foi amplificado com os iniciadores para o gene WSP, cujo resultado indica a presença do inserto (figura 12, posição no gel 7). A colônia 10 também foi submetida a amplificação pelos iniciadores específicos para o gene WSP. O resultado obtido evidenciou a presença do inserto WSP no vetor (figura 12, posição no gel 8).

O controle para a presença do vetor nas colônias transformadas 50 e 51, contendo sequências WSP obtidas a partir de hospedeiro *Ae. albopictus*, foram obtidos a partir dos produtos da extração dos vetores das colônias transformadas. Em seguida, amplificados com os iniciadores do vetor. As posições 7 e 8 da figura 13 indicam a presença do vetor nas colônias 50 e 51. A presença do inserto referente a sequência do gene WSP, também foi confirmada para as mesmas colônias, devido a obtenção de um produto amplificado a partir dos iniciadores específicos para WSP (Figura 13, posições 5 e 6)

Os produtos da extração de colônias contendo o vetor de transformação derivado de experimentos iniciados a partir do hospedeiro *Ae. albopictus* também foram amplificados. Através da combinação dos iniciadores T7 F - 691 R, e T7 F - 81 F/Kozak foi possível a confirmação da orientação do inserto no vetor. Nas posições 1 e 3 (Figura 13) as amplificações foram feitas utilizando a combinação dos iniciadores T7 F e 691 R para as colônias 50 e 51. Nas posições 2 e 4 as amplificações das colônias 50 e 51 respectivamente, foram realizadas utilizando a combinação dos iniciadores T7 R e 81 F/Kozak. Ambas as amplificações confirmaram a correta inserção do inserto para as duas colônias.

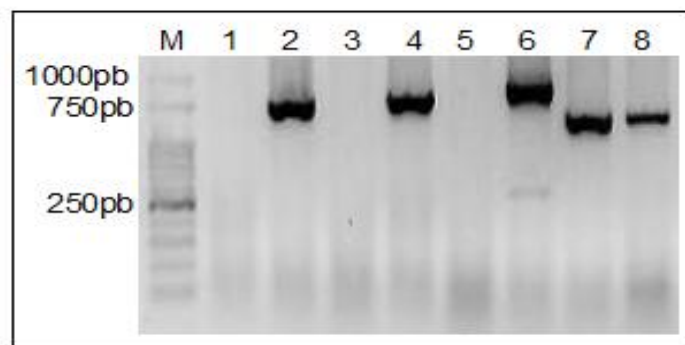


Figura 12 - Amplificação do produto da extração de vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Solenopsis saevissima*. 1 e 2 - utilizando os iniciadores T7 F e 691 R; 3 e 4 - Utilizando os iniciadores T7 R e 81 F/Kozak; 5 e 6 - utilizando os iniciadores T7 F e R; 7 e 8 - Utilizando os iniciadores 691 R e 81 F/Kozak; M - marcador molecular 50pb (Ludwig).

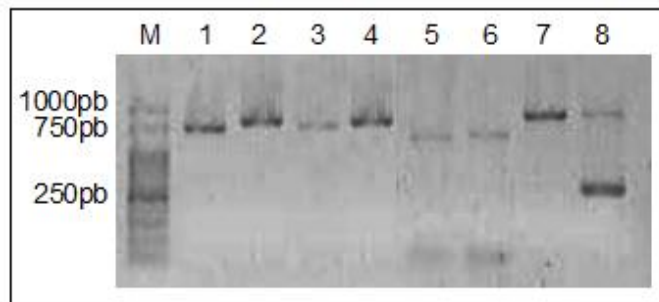


Figura 13 - Amplificação do produto da extração de vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Aedes albopictus*. 1 e 3 - utilizando os iniciadores T7 F e 691 R; 2 e 4 - utilizando os iniciadores T7 R e 81 F/Kozak; 5 e 6 - utilizando os iniciadores 691 R e 81 F/Kozak; 7 e 8 - utilizando os iniciadores T7 R e F; M - marcador molecular 50pb (Ludwig).

4.5 Eficiência da transformação das colônias

4.5.1 Ensaios a partir do segmento WSP derivado do hospedeiro *S. saevissima*.

A frequência de sucesso da transformação do vetor ligado ao inserto derivado do hospedeiro *S. saevissima* das colônias selecionadas foi de 31%. A frequência da transformação devido à presença do vetor na ausência do inserto ligado nas colônias selecionadas foi de 69% (figura 14A).

Entre as colônias transformadas que continham o vetor ligado ao inserto verificamos que 44% dessas colônias apresentaram a orientação correta de inserção e 56% apresentaram inversão na inserção da sequência WSP durante a clonagem (figura 14B).

4.5.2 Ensaios a partir do segmento WSP derivado do hospedeiro *Ae. albopictus*.

A frequência de sucesso da transformação do vetor ligado ao inserto derivado do hospedeiro *Ae. albopictus* das colônias selecionadas foi de 65%. A frequência da transformação devido à presença do vetor na ausência do inserto ligado nas colônias selecionadas foi de 35% (figura 15A).

Entre as colônias transformadas que continham o vetor ligado ao inserto verificamos

que 23% dessas colônias apresentaram a orientação correta de inserção e 77% apresentaram inversão na inserção da sequência WSP durante a clonagem (figura 15B).

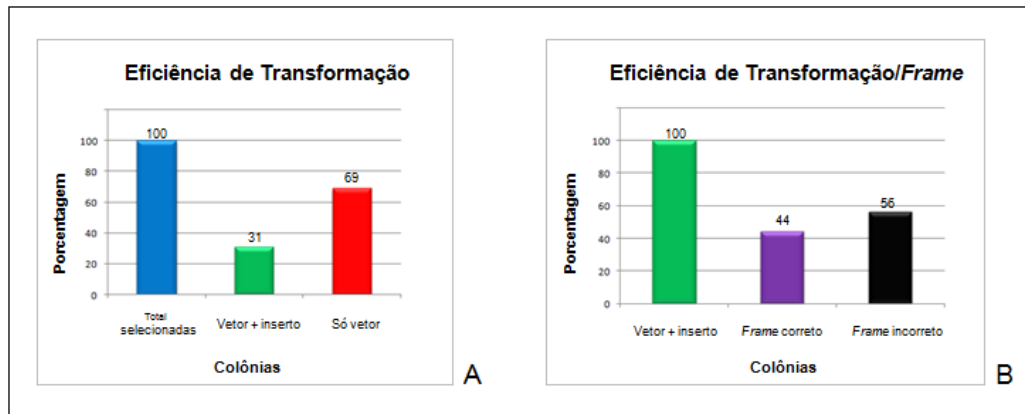


Figura 14 - Percentual de células transformadas pelo vetor pEXP5-CT/TOPO contendo ou não o inserto derivado do hospedeiro *Solenopsis saevissima*. A – Percentual de células contendo o vetor/inserto dentre as células selecionadas (verde) e percentual de células contendo somente o vetor (vermelho), dentre as células selecionadas; B – Percentual de células com a orientação do inserto correta dentre as células contendo vetor/inserto (roxo) e percentual de células com a orientação do inserto invertida (preto), dentre as células contendo vetor/inserto.

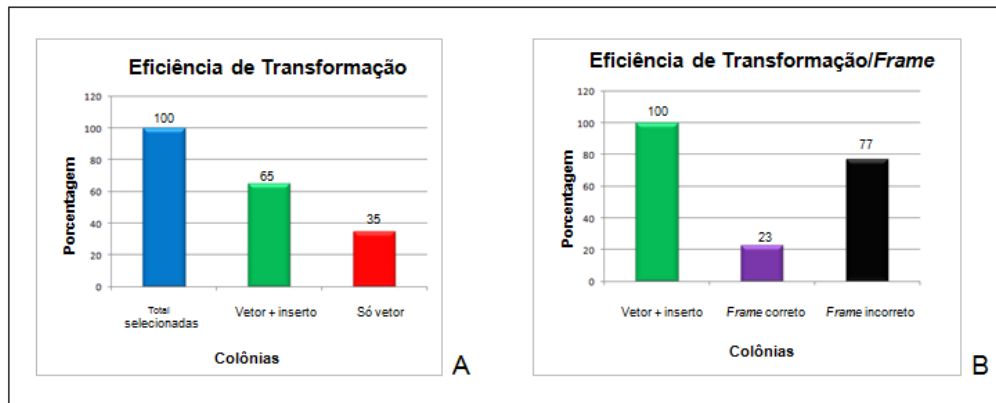


Figura 15 - Percentual de células transformadas pelo vetor pEXP5-CT/TOPO contendo ou não o inserto derivado do hospedeiro *Aedes albopictus*. A – Percentual de células contendo o vetor/inserto dentre as células selecionadas (verde) e percentual de células contendo somente o vetor (vermelho), dentre as células selecionadas; B – Percentual de células com a orientação do inserto correta dentre as células contendo vetor/inserto (roxo) e percentual de células com a orientação do inserto invertida (preto), dentre as células contendo vetor/inserto.

4.6 Análises de espectrofluorescência

A expressão do peptídeo recombinante depende de uma concentração mínima do DNA

(ng/ μ L), portanto as amostras selecionadas contendo a correta inserção da sequência *wsp*, antes de serem utilizadas, foram quantificadas por espectrofluorescência.

A tabela 2 apresenta os resultados da concentração do DNA total, resultante da extração do vetor, contendo o inserto *wsp* derivado do hospedeiro *S. saevissima*. E a tabela 3 apresenta os resultados da concentração de DNA total resultante de extração do vetor contendo o inserto WSP derivado do hospedeiro *Ae. albopictus*.

Tabela 2 - Concentração de DNA total estimado por Espectrofluorescência na solução de extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Solenopsis saevissima*

Amostras	Concentração do DNA total (ng/uL)	Coefficiente de Absorbância em 260/280 (nm)
Colônia 3	144.4	1.97
Colônia 4	312.4	1.91
Colônia 6	165.0	1.87
Colônia 10	244.9	1.94

Tabela 3 - Concentração de DNA total estimado por Espectrofluorescência na solução de extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Aedes albopictus*

Amostras	Concentração do DNA total (ng/uL)	Coefficiente de Absorbância em 260/280 (nm)
Colônia 49	459.3	1.87
Colônia 50	383.1	1.88
Colônia 51	328.0	1.85

4.7 Caracterização das sequências do inserto. Sequenciamento

As amostras selecionadas, contendo a orientação do inserto na direção correta também foram submetidas à análise por sequenciamento e posteriormente foram comparadas. A figura

16A apresenta a comparação entre a sequências do gene WSP derivado do hospedeiro *S. saevissima* (wsae) e a sequência do gene WSP derivado do hospedeiro *Ae. albopictus* (walb). Foi verificado um considerável número de substituições entre as sequências de WSPexaminadas.

A sequência de aminoácidos também foi comparada entre ambos os hospedeiros distintos (Figura 16 B). É possível verificar que as substituições de bases implicaram em substituição de aminoácidos na seqüência marcadora de *Wolbachia*. Ambos os resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que a porção do gene WSP amplificado constitui uma região de expressiva variação. Além disso, esse resultado está de acordo com a hipótese de que o peptídeo WSP possa constituir um elemento importante na associação com a célula hospedeira.

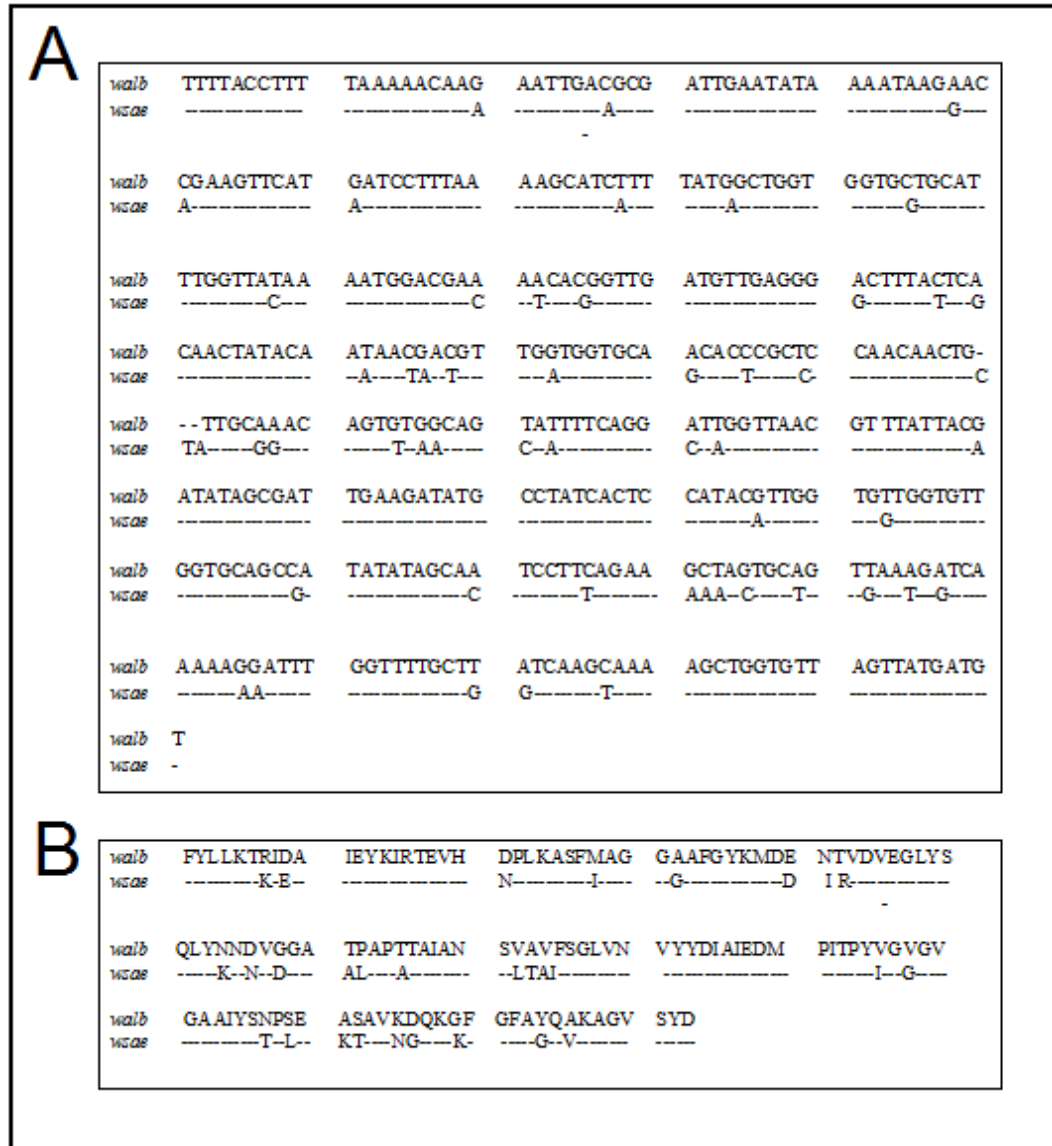


Figura 16 - Caracterização da sequência do inserto. A: comparação entre a sequência do gene WSP derivado do hospedeiro *Aedes albopictus* (*walb*) e a sequência do gene WSP derivado do hospedeiro *Solenopsis saevissima* (*wsae*). Sítio 119 à 520 – Maega 4.0. B: comparação entre a sequência de aminoácidos do gene WSP derivado do hospedeiro *Aedes albopictus* (*walb*) e a sequência do gene WSP derivado do hospedeiro *Solenopsis saevissima* (*wsae*).

4.8 Ensaio de expressão do peptídeo recombinante WSP

A partir do protocolo do fabricante, foram realizados até o momento, 13 ensaios de expressão da proteína recombinante. Sendo que, em sete ensaios foram utilizados os produtos da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Ae. albopictus* e em seis ensaios foram utilizados os produtos da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *S. saevissima*. As amostras testadas nos ensaios foram selecionadas de acordo com

a maior concentração do DNA (tabelas 2 e 3).

4.8.1 Ensaio de expressão do peptídeo recombinante. Determinação do tempo de incubação.

O protocolo proposto pelo fabricante não estabelece o tempo de incubação do vetor com os reagentes e o sistema de tradução *in vitro* para obtenção da concentração ótima do peptídeo.

Assim sendo, procuramos padronizar dentro do intervalo de 3 e 6 horas, o tempo de incubação do extrato de *E. coli* otimizado contendo os componentes da maquinaria de expressão e o vetor/inserto.

Entretanto, os resultados não foram conclusivos. Na figura 17 foram comparados os resultados obtidos entre as amostras incubadas durante 3, 4, 5 e 6 horas, correspondentes às posições de 1 a 4 no gel, respectivamente. As discretas variações na densidade observadas no gel não asseguraram que houve variação na concentração do produto peptídico a partir do sistema *in vitro* de expressão. Até o presente momento, a concentração peptídica no extrato não foi estimada devido ao reduzido volume obtido das amostras.

Apesar dos resultados não conclusivos, optamos por uma incubação de 4 horas para todos os demais ensaios.

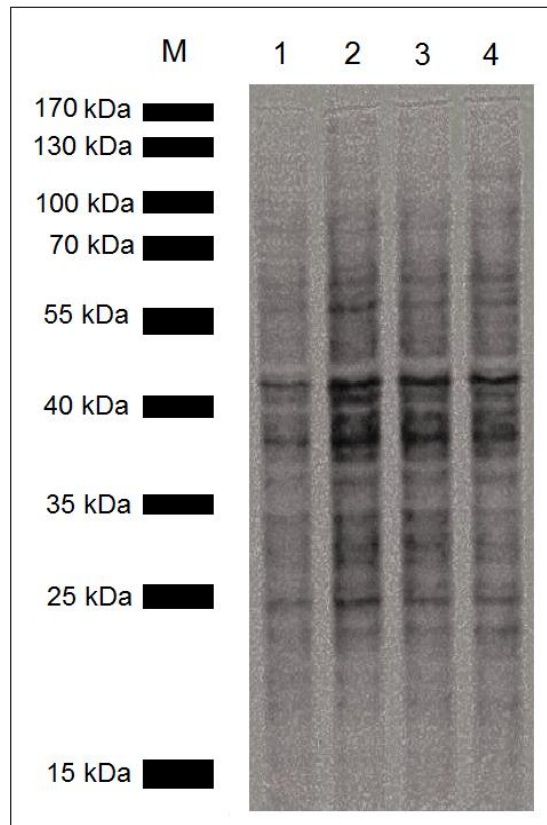


Figura 17 – Determinação do tempo de incubação. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12.5%, corado com nitrato de prata. 1 - ensaio com 3 horas de incubação; 2 - ensaio com 4 horas de incubação; 3 - ensaio com 5 horas de incubação; 4 - ensaio com 6 horas de incubação; M - marcador molecular *PageRuler Prestained* (Fermentas).

4.9 Identificação do peptídeo recombinante.

As amostras contendo o vetor/inserto, nas quais foram obtidos os resultados positivos em relação aos parâmetros requeridos no *kit 'Expressway Cell-Free E. coli System'*, assim como, o controle negativo (ausência do vetor) foram submetidos a eletroforese em gel de acrilamida 12,5% para visualização dos peptídeos sintetizados.

4.9.1 Identificação através de coloração inespecífica. *Comassie Blue*.

Foram realizados quatro ensaios:

- Produtos da extração do vetor obtidos a partir do hospedeiro *S. saevissima* (figura 18,

posição 2);

- Produtos da extração do vetor obtidos a partir do hospedeiro *Ae. albopictus* (figura 18, posições 3 e 4);
- Controle negativo, posição 1 (figura 18).

Através da utilização de coloração inespecífica em *Comassie Blue*, não foi possível identificar o produto peptídico de interesse, correspondente ao gene WSP. O conteúdo molecular do kit *Expressway Cell-free E.coli System* contém inúmeros peptídeos, os quais dificultam a identificação, inclusive quando as amostras foram comparadas com o grupo controle.

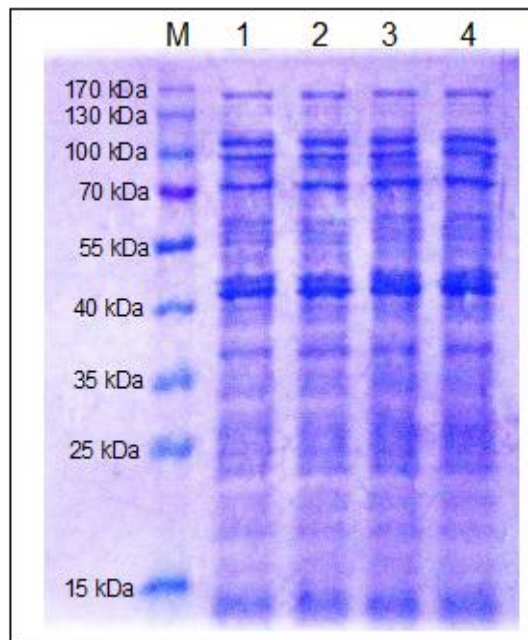


Figura 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, corado com comassie blue. 1 - controle negativo; 2 - hospedeiro *Solenopsis saevissima*; 3 e 4 - hospedeiro *Aedes albopictus*; M - marcador molecular *PageRuler Prestained* (Fermentas).

4.9.2 Identificação através de coloração específica para cauda de histidina.

InVision His-tag.

Durante a expressão da sequência WSP foram introduzidos seis resíduos de histidina na extremidade C-terminal do peptídeo recombinante. Devido à implantação da cauda de

histidina no peptídeo recombinante, utilizamos em nosso estudo a metodologia de identificação do peptídeo através de coloração fluorescente específica para resíduos de histidina.

Os resultados obtidos são apresentados na figura 19. O controle negativo na posição 1 do gel indica a fluorescência basal do método.

Nas posições 3, 4, 5 e 6 do gel (figura 19) foram aplicadas as amostras derivadas dos ensaios de expressão a partir de produtos da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *S. saevissima*. As posições 7, 8 e 9 correspondem aos ensaios obtidos a partir de produtos da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Ae. albopictus*.

Nas posições 4 e 6 as amostras foram concentradas em evaporador centrífugo Speed Vac antes de serem aplicadas. A posição 2 não contém amostra. Através dessa metodologia foi possível identificar a expressão do peptídeo recombinante. O peso molecular foi estimado entre 15 e 20 kDa, a impressão se deve ao “rastros” deixado no gel pelo sistema de coloração empregado.

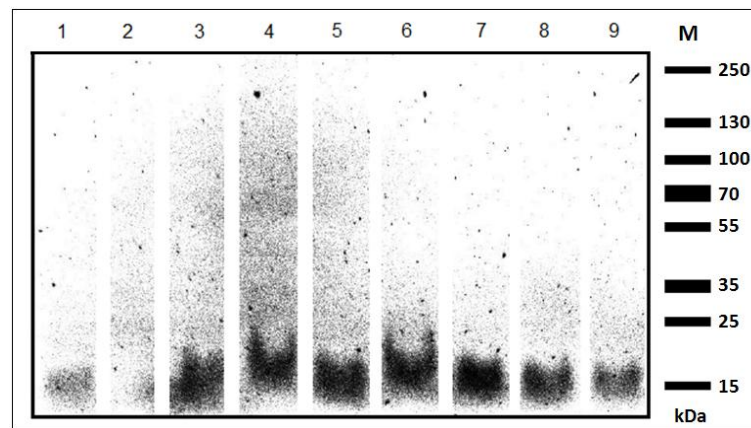


Figura 19 - Gel de poliacrilamida 12,5%, corado com *InVision His-tag*. 1 - controle negativo; 2 - sem amostra; 3 ao 6 - hospedeiro *Solenopsis saevissima*, sendo que 4 e 6 amostras concentradas de 3 e 5 respectivamente; 7 ao 9 - hospedeiro *Aedes albopictus*; M - marcador molecular *PageRuler Prestained* (Fermentas).

4.9.3. Identificação através de coloração específica para cauda de histidina - anticorpo anti-histidina. *Western Blot*

O ensaio anticorpo-específico para resíduos de histidina foi aplicado em sistema *western blot* para caracterização e confirmação da expressão do peptídeo de interesse. Após a

eletrotransferência dos peptídeos para uma membrana de nitrocelulose (NC), a NC foi corada com *Ponceau*, para confirmação da eletrotransferência.

A partir da eletrotransferência dos peptídeos para a membrana de nitrocelulose, esta foi exposta à anticorpos primário e em seguida à anticorpo secundário conjugado e revelado em filme de autoradiografia (Hyperfilm™ ECL) conforme protocolo do fabricante (GE Healthcare – Amershan).

Na posição 9 da figura 20 foi adicionado o controle negativo. Nas posições 1, 2 e 3 estão os ensaios a partir de produtos da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *Ae. albopictus* e nas posições 4, 5, 6, 7, e 8 estão os ensaios a partir de produtos da extração do vetor contendo o inserto derivado do hospedeiro *S. saevissima*.

Foi possível uma discreta reação do peptídeo recombinante nas amostras 1, 2 e 6, próximas ao peso de molecular de 17kDa, esperado para os resíduos de aminoácidos conforme sequência determinada no presente estudo (figura 16 B). Todavia, devido a reduzida resolução obtida através de anticorpos anti-histidina, foram desenvolvidos ensaios para a purificação dos homogeneizados.

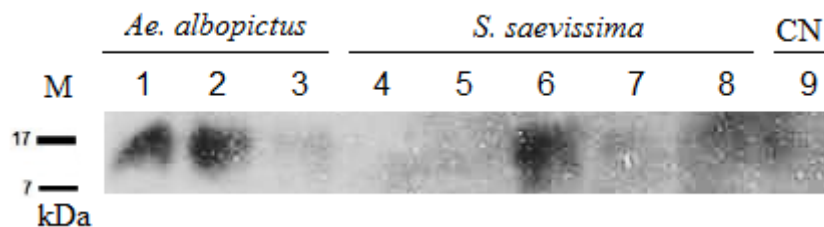


Figura 20 - Imunoreatividade à calda de histidina de amostras de proteínas do extrato total da síntese *in-vitro*, cell-free. 1 ao 3 - síntese a partir de extraído de DNA de *Aedes albopictus* ; 4 ao 8 - síntese a partir de extraído de DNA de *Solenopsis saevissima* ; 9 - controle negativo; M - marcador molecular Kaleidoscope (Bio-Rad).

4.9.4 Identificação através de cromatografia de afinidade

Para a purificação do peptídeo WSP, o extrato total sintetizado foi aplicado em coluna de Níquel e posteriormente submetido à cromatografia de afinidade. O peptídeo WSP foi eluído com 10mM de Imidazol. As alíquotas foram coletadas para análise em eletroforese, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 21.

Na posição A da figura 21, é apresentado o resultado em gel da alíquota contendo a

amostra do peptídeo recombinante WSP obtido a partir do hospedeiro *S. saevissima*. Na posição B da figura 21, é apresentado o resultado em gel da alíquota contendo a amostra do peptídeo recombinante WSP obtido a partir do hospedeiro *Ae. albopictus*.

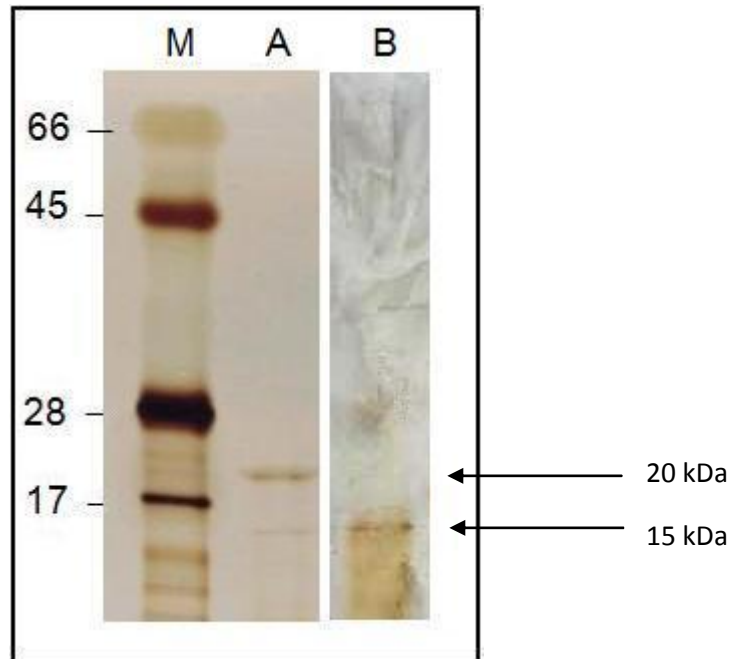


Figura 21: Eletroforese em gel de poli-acrilamida 12,5%. Peptídeo WSP derivado de hospedeiros distintos de *Wolbachia*, purificado por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel (Seta). M – marcador molecular. A – derivado de hospedeiro *Solenopsis saevissima* (20kDa e 15kDa). B - derivado de hospedeiro *Aedes albopictus* (15kDa).

Foi possível constatar que dois produtos peptídicos recombinantes distintos foram obtidos a partir de *Wolbachia* derivada de *S. saevissima*. Um desses peptídeos possui um peso molecular de aproximadamente 20kDa e o outro 15kDa. Entretanto, o mesmo não foi obtido a partir de seqüências amplificadas do endossimbionte derivado do mosquito *Ae. albopictus*.

Os ensaios desenvolvidos no presente estudo possibilitaram a aplicação de um protocolo comercial de expressão *in vitro* - *cell free* para a obtenção de um peptídeo recombinante. Apesar da simplicidade do *kit* de expressão, os resultados obtidos indicam aplicações limitadas para o emprego do *kit*, sobretudo em relação à dificuldade imposta pelo protocolo na identificação e estimativa da concentração final do peptídeo recombinante.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A incomum biologia da *Wolbachia* e as dificuldades relativas ao estudo experimental da bactéria, sobretudo devido à impossibilidade de manter culturas desse microorganismo, estimularam o desenvolvimento do presente estudo. A *Wolbachia*, membro da ordem Rickettsiales, é um endossimbionte, o qual se diferencia dos outros membros dessa ordem devido à capacidade de alterar de modo peculiar os processos celulares de seus hospedeiros. A espécie *Candidatus cardinium* apresenta semelhança em relação a essas alterações, sobretudo no que diz respeito ao seu modo de infecção (GOTHO *et al.*, 2007).

Além da partenogênese e da feminização, alguns dos efeitos induzidos pela *Wolbachia* em seus hospedeiros (ARAKAKI *et al.*, 2001; VANDEKERCKHOVE *et al.*, 2003), também pode provocar a morte de embriões machos durante a embriogênese, resultando no aumento quantitativo e talvez qualitativo de embriões do sexo feminino (KAGEYAMA *et al.*, 2004). Cada uma dessas alterações reprodutivas, descritas anteriormente, indica que o aumento na prevalência de fêmeas infectadas constitui uma estratégia evolutiva acarretando à *Wolbachia* e ao seu hospedeiro infectado um valor adaptativo maior na população. Essa deve ser uma das razões do elevado índice de prevalência e disseminação do endossimbionte em populações naturais de insetos.

Outra razão para que o presente estudo tenha enfatizado a *Wolbachia* como material de estudo é devido ao efeito da incompatibilidade citoplasmática. Este constitui um modelo de transmissão característico deste endossimbionte (WERREN *et al.*, 2008). Assim, entendemos que o desenvolvimento de métodos de análise e caracterização do endossimbionte deverá auxiliar os estudos relativos à biologia desses organismos, assim como ampliar as formas de abordagens experimentais.

Estimativas do nível de prevalência de *Wolbachia* nos insetos hospedeiros são realizadas através da amplificação de genes marcadores. Em nosso estudo, a infecção foi detectada por intermédio da amplificação de uma seqüência de aproximadamente 600pb do gene WSP (*Wolbachia surface protein*) (BRAIG, 1998). O marcador WSP é frequentemente utilizado como marcador para infecções de diferentes cepas de *Wolbachia*. O tamanho aproximado do gene WSP é de 700pb (KLASSON *et al.*, 2008), o que inclui regiões que codificam áreas conservadas, principalmente aquelas correspondentes a região intermembranosa do peptídeo e porções variáveis.

Em nosso estudo, a infecção natural entre os hospedeiros *Ae. albopictus* e *S. saevissima* foi evidenciada através da amplificação do gene WSP, (Figuras 4C e 4D). Verificamos que o nível de prevalência obtido em hospedeiros *Ae. albopictus* foi de 100% o que está de acordo com diversos outros estudos realizados nessa espécie hospedeira (ROUSSET *et al.*, 1992; STOUTHAMER *et al.*, 1993; O'NEILL *et al.*, 1995; KITTAYAPONG *et al.*, 2002; ZOUACHE *et al.*, 2009).

Após o nosso grupo evidenciar a presença da *Wolbachia* em formigas *S. saevissima* (SOUZA *et al.*, 2009), estimamos o nível de prevalência nessa espécie, cujo os valores obtidos variaram entre 44% e 90%, o qual é consideravelmente menor do que aquele verificado em *Ae. albopictus*. De acordo com o modelos teóricos propostos por Turelli (1994), níveis de prevalência baixo são instáveis. Muitos estudos evidenciaram a infecção de *Wolbachia* em outras espécies do gênero *Solenopsis*, os quais apresentaram níveis de prevalência significativamente diferentes entre as espécies hospedeiras e aquele obtido para *S. saevissima* (JEYAPRAKASH & HOY 2000; SHOEMAKER *et al.*, 2000; KELLER *et al.*, 2001; VAN BORM *et al.*, 2001; WENSELEERS *et al.*, 2002; VAN BORM *et al.*, 2003).

Existe grande variação nas sequências de WSP depositadas no *GenBank* relativo as variantes de *Wolbachia* obtidas a partir de diferentes espécies de hospedeiros. O peptídeo expresso pelo gene WSP constitui uma proteína integral da membrana celular da bactéria. Conforme relatado anteriormente, a porção intermembranosa é conservada entre os diferentes supergrupos de *Wolbachia*, contudo a porção extracelular constitui uma região hipervariável, o que tem sido considerado como fator importante na interação hospedeiro-simbionte (JIGGINS *et al.*, 2002).

No presente estudo sequenciamos o gene WSP derivado de ambos os hospedeiros, *Ae. albopictus* e *S. saevissima* e comparamos ambas as sequências. Os resultados obtidos (Figura 16A) confirmaram a significativa variação nas sequências de WSP entre os hospedeiros. A partir das sequências, obtivemos a cadeia correspondente de aminoácidos para cada um dos peptídeos WSP derivados de *Ae. albopictus* e *S. saevissima* (figura 16 B).

As sequências do gene WSP derivado de *S. saevissima*, determinada pelo nosso grupo, foi depositada no banco de dados *Genbank* (n^{os}. de acesso EU251431 e EU251432), as quais poderão auxiliar em futuros estudos filogenéticos do endossimbionte e do próprio hospedeiro (DEDEINE *et al.*, 2005; SHOEMAKER *et al.*, 2000).

A seguir, efetuamos a purificação e a clonagem de parte do peptídeo WSP. A utilização de ambos os hospedeiros para a purificação do antígeno foi devido à variação observada na sequência de aminoácidos do peptídeo. Portanto, na hipótese de obtenção de um

soro anti-WSP, como sonda molecular para a identificação do microorganismo, consideramos a possibilidade de que esta possa vir a ser variante-específica para *Wolbachia* oriunda de diferentes hospedeiros. Estudos envolvendo a identificação histológica do endossimbionte, bem como o desenvolvimento de métodos de purificação de antígenos marcadores poderão ser auxiliados através do uso de um anticorpo específico.

Desse modo, existe considerável interesse para a obtenção de soros *anti-WSP*. Embora soros policlonais para *Wolbachia* tenham sido obtidos em outros estudos (MASUI *et al.*, 2001), o objetivo da expressão recombinante da porção extracelular do peptídeo WSP é o de possibilitar a síntese de anticorpos específicos aplicados a porção variável desse antígeno, os quais poderiam constituir uma sonda antigênica aplicada à variantes específicas do simbionte.

Para tanto, selecionamos diversos métodos para a obtenção do peptídeo WSP recombinante.

Entre os métodos examinados, selecionamos o sistema *Expressway cell-free*, tendo em vista a vantagem de dispensar a utilização de culturas, o que foi determinante para viabilizar nossos experimentos. Além disso, a simplicidade na sua aplicação, bem como a possibilidade de obtenção do peptídeo em um curto período de tempo foi considerada na escolha do método. As fases intermediárias são igualmente simples e passíveis de serem adaptadas às condições do nosso laboratório.

A aplicação desse modelo experimental para a expressão de peptídeos recombinantes em sistemas *cell-free* é incomum. Até o presente momento não havia sido aplicado para obtenção de peptídeos recombinantes a partir de microorganismos endossimbiontes. Desse modo o presente estudo aproveitou os experimentos para efetuar uma análise da viabilidade operacional dessa metodologia. Análises relativas ao desempenho e a concentração do produto peptídico foram consideradas. Desse modo, objetivamos a obtenção do peptídeo-alvo, ao mesmo tempo em que avaliamos a eficiência e a viabilidade do sistema *cell-free* de expressão.

O DNA total foi extraído a partir de homogeneizados dos insetos hospedeiros. A sequência variável do gene WSP foi amplificada através de metodologia de rotina em sistema PCR (figura 4). A seguir as sequências foram clonadas em vetor específico pEXP5-CT/TOPO[®] (Invitrogen). Selecionamos colônias transformadas crescidas em placa de Petri sem a utilização X-Gal, como fez Hildebrandt (2009). De acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen), após a clonagem do vetor, a seleção das bactérias clonadas foi realizada somente através do crescimento em meio contendo ampicilina. Entretanto, uma vez

que as colônias transfectadas pelo vetor crescem em presença de ampicilina, independente da presença do inserto no vetor, foi então necessário a confirmação da transformação das bactérias competentes com o vetor pEXP5-CT/TOPO[®] ligado ao inserto. Para isso foi empregado a mesma técnica que Samra (2008). A amplificação em sistema PCR foi realizada a partir do DNA obtido diretamente das colônias, no qual foram utilizados os iniciadores específicos do vetor, conforme Gao (2009). O resultado positivo indicou a presença do inserto no vetor, o que pode ser observado nas figuras 8A e 9A.

Durante nossos experimentos foi necessário desenvolver uma metodologia própria para a determinação da orientação do inserto. Utilizamos novamente a amplificação em sistema PCR como método de análise. Diferente do método utilizado por Li (2008), onde foram utilizadas enzimas de restrição para segmentar o vetor associado ao inserto de interesse, e somente em seguida sequenciar a porção resultante do vetor que se mantinha ligada ao inserto e então verificar a orientação. Em nosso estudo utilizamos iniciadores específicos do vetor e do inserto em conjunto para obter essa confirmação, conforme as hipóteses formuladas nas figuras 2 e 3 (ver Mat. e Métodos). As formulações apresentadas nas hipóteses de inserção basearam-se na possibilidade de anelamento dos diferentes iniciadores utilizados, bem como na especificidade da ação polimerase ($5' \rightarrow 3'$) da enzima *Taq*. Assim, somente teríamos produtos de amplificação, e o tamanho esperado da sequência amplificada, se as extremidades 3' dos iniciadores utilizados se posicionassem em direções opostas em cada uma das fitas complementares. Então, conforme os resultados obtidos (Figuras 10, 11, 12 e 13), foi possível selecionar as colônias, cujo vetor apresentou o inserto na orientação correta.

Após a confirmação da orientação do inserto, foram extraídos os vetores das colônias selecionadas. De acordo com o protocolo do *kit* de expressão, foi necessário estimar a concentração de DNA total obtido das colônias (Tabela 2 e 3). Selecionamos as amostras que obtiveram um valor de concentração de DNA total mais próximo ou até mesmo superior ao valor mínimo requerido pelo protocolo do fabricante, visando o melhor desempenho nas reações de expressão. Submetemos as amostras selecionadas ao ensaio de expressão de peptídeo recombinante de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante.

Entretanto, os protocolos não estabeleceram o tempo-ótimo para a obtenção do peptídeo recombinante. Desse modo, efetuamos diversos ensaios com diferentes tempos de expressão com o objetivo de padronizar o tempo ótimo necessário para a síntese do peptídeo WSP-recombinante.

Após a análise eletroforética da expressão do peptídeo recombinante em relação ao tempo de incubação (figura 17), optamos em padronizar o tempo dos demais ensaios em

quatro horas de incubação mínima. Esta decisão foi proposta em razão da discreta diferença na resolução das bandas no gel. Todavia, em razão do reduzido volume das amostras e da presença de diversos reagentes na amostra, não obtivemos estimativas seguras para a concentração do substrato peptídico específico.

A presença de grande quantidade de reagentes nas amostras constituiu a principal dificuldade para aferir a eficiência de expressão do peptídeo recombinante. Mesmo quando, entre as amostras analisadas em gel, foram incluídas amostras-controle “brancas” (ausência do peptídeo recombinante) não foi possível evidenciar o peptídeo-alvo (Figura 18). Desse modo, o método de expressão *in vitro* deve incluir a adição de reagentes suplementares, os quais permitiriam a "marcação" molecular do produto de expressão, de modo semelhante aos que foram empregados, a seguir, em nosso estudo.

Foram empregados diferentes métodos para evidenciar a eficiência de expressão.

A expressão da sequência WSP através do vetor pEXP5-CT/TOPO[®], inclui seis resíduos de histidina na extremidade C-terminal do peptídeo recombinante. Optamos então por métodos que se utilizassem do marcador de histidina para evidenciar a expressão do peptídeo recombinante.

Inicialmente, utilizamos o sistema de coloração *InVision His-tag* (Invitrogen) para identificação da expressão, e a partir da coloração fluorescente específica para resíduos de histidina. O extrato total do ensaio de expressão foi submetido à eletroforese e após o término da corrida coramos o gel com o *InVision His-tag* (Figura 19). Através da utilização desse sistema *InVision His-tag* foi possível evidenciar um produto peptídico, cujo peso molecular variava entre 12 e 20 kDa, contendo a cauda de histidina. Todavia, a estimativa do peso molecular do peptídeo recombinante foi apenas parcialmente discriminada nesse ensaio, devido a dificuldade de resolução do marcador molecular através da coloração utilizando o *InVision His-tag*. Além disso, a coloração apresentou sensibilidade a resíduos do marcador depositados e impregnados durante o processo de coloração, o que dificultou a identificação nas amostras experimentais positivas.

Em seguida, empregamos para a identificação do WSP-recombinante o anticorpo anti-histidina, o qual reconhece peptídeos portadores de extremidade contendo resíduos de histidina. Através da utilização em sistema *western blot*, o extrato total do ensaio de expressão do peptídeo recombinante foi mais uma vez submetido à eletroforese e após o término da corrida, efetuamos a eletrotransferência do gel para uma membrana de nitrocelulose.

Através da coloração da membrana com *Ponceau*, confirmamos o sucesso da eletrotransferência. Após a visualização das bandas, descoramos e submetemos a membrana à

incubação com o anticorpo primário Monoclonal Anti-poli-histidina produzido em camundongo (Sigma). Lavada, submetemos a membrana a nova incubação, agora com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo, com enzimas peroxidase (Sigma). Utilizamos do *kit Amersham ECL Advance Western Blotting Detectem* para a identificação do peptídeo recombinante. Em sala escura expusemos a membrana ao filme radiográfico *Amersham Hyperfilm ECL - High Performance Chemiluminescent Film*, e submetemos o mesmo ao tampão revelador e em seguida ao tampão fixador (ambos fornecidos pelo kit). Através do filme radiográfico identificamos o peptídeo marcado pela cauda de histidina. Através do marcador molecular foi possível estimar o peso molecular do peptídeo recombinante em aproximadamente 15kDa (Figura 20). Essa estimativa está de acordo com o esperado para a sequência de aminoácidos, segundo o que foi obtido para o antígeno WSP, depositado no GenBank e confirmado através do nosso sequenciamento (figura 16 B).

Confirmada a síntese do peptídeo WSP-recombinante, efetuamos a purificação do homogenado total utilizando uma coluna de níquel, a qual retém antígenos, desde que estes possuam uma calda poli-A, como é o caso do WSP-recombinante obtido em nosso estudo. Somente após a cromatografia de afinidade foi possível a purificação do peptídeo WSP-recombinante.

Após a purificação desse peptídeo, foi possível evidenciar diferenças entre os antígenos de *Ae. albopictus* e de *S. saevissima*, através da análise da massa molecular estimada para o peptídeo recombinante derivado de ambas as espécies de insetos hospedeiros (figura 21). Foi possível evidenciar que a partir de *Wolbachia* derivada de *S. saevissima* foram obtidos dois diferentes peptídeos recombinantes de acordo com a massa molecular, o que reafirmou a múltipla infecção desse hospedeiro (Figura 21, coluna A). Uma vez que em estudo anterior (SOUZA *et al.*, 2009), desenvolvido em nosso laboratório, foi proposta a múltipla infecção por diferentes variantes genéticas do endossimbionte, deduzida através de inúmeras sequências obtidas a partir de diferentes populações de formiga.

No presente estudo, obtivemos pela primeira vez a expressão de WSP em sistema *cell-free*. Diante dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que a utilização de *kits* de expressão que utilizam o sistema *cell-free* pode constituir método promissor para obtenção de peptídeos recombinantes. A simplicidade da técnica é o maior diferencial comparativo aos demais métodos que empregam cultura de células para o mesmo objetivo. Apesar das necessárias adaptações da técnica e do próprio protocolo do fabricante, obtivemos o peptídeo de interesse em um único microtubo no intervalo de até 6 horas. Dificuldades relativas à confirmação da expressão do peptídeo foram decorrentes dos inúmeros peptídeos presentes na

solução de expressão. Após a purificação do extrato total, evidenciamos diferenças moleculares entre os antígenos de *Aedes albopictus* e *Solenopsis saevissima*, e foi possível evidenciar também a diferença molecular desse antígeno intraespecífica, confirmando a múltipla infecção por *Wolbachia*.

O sucesso na síntese e purificação do peptídeo marcador de *Wolbachia*, possibilitará a obtenção de anticorpos policlonais específicos para WSP. Aos mais, poderão ser selecionados a partir de dois critérios, o primeiro é o de imunogenicidade específica e o segundo critério possibilitando a identificação de linhagens ou variantes genética de *Wolbachia*. O segundo critério poderá auxiliar a taxonomia desse endossimbionte.

REFERÊNCIAS

- AHRENS, Michael. SHOEMAKER, Dewayene. **Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta***. 2005. *Evol. Biol.* 31;5(1):35.
- ARAKAKI, Norio. MIYOSHI, Takeharu. NODA, Hiroak. ***Wolbachia* mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta)**. 2001. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268, 1011–1016.
- AZZOUNA, Ate. GREVE, Pierre. MARTIN, Gilbert. **Sexual differentiation traits in functional males with female genital apertures (male symbol fga) in the woodlice *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda, Crustacea)**. 2004. *Gen Comp Endocrinol.* 138:42–49.
- BALDO, Laura. BARTOS, John. WERREN, John. BAZZOCCHI, Chiara. *et al.* **Different rates of nucleotide substitutions in *Wolbachia* endosymbionts of arthropods and nematodes: arms race or host shifts?** 2002. *Parasitologia.* 44(3-4):179-87.
- BALDO, Laura. LO Nathan. WERREN, John. **Mosaic nature of the *wolbachia* surface protein**. 2005. *Journal Bacteriol.* **187**(15):5406-5418.
- BALDO, Laura. DUNNING, Julie. JOLLEY, Keith. BIBER, Sarah. *et al.* **Mult locus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis***. 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(11): 7098-7110.
- BALDO, Laura. DESJARDINS, Christopher. RUSSELL, Jacob. STAHLHUT, Julie. WERREN, John. **Accelerated microevolution in an outer membrane protein (OMP) of the intracellular bacteria *Wolbachia***. 2010. *BMC Evolutionary Biology*, 10:48.
- BANDI, Claudio. ANDERSON, Tim. GENCHI, Claudio. BLAXTER, Mark. **Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes**. 1998. *Proc. Biol. Sci.* 22;265(1413):2407-13.
- BANEYX, François. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli***. 1999. *Curr. Opin. Biotechnol.* 461: 45-61.
- BAZZOCCHI, Chiara. JAMNONGLUK, Wanwisa. O'NEILL, Scott. ANDERSON, Tim. GENCHI, Claudio. BANDI, Claudio. ***wsp* gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes**. 2000a. *Curr. Microbiol.* ;41(2):96-100.

BAZZOCHI, Claudio. CECILIANI, Fabrizio. McCALL, John. RICCI, Irene. GRENCI, Claudio. BANDI, Claudio. **Antigenic role of the endosymbionts of filarial nematodes: IgG response against the *Wolbachia* surface protein in cats infected with *Dirofilaria immitis*.** 2000b. Proc Biol Sci. 22;267(1461).

BAZZOCCHI, Claudio. BANDI, Claudio *et al.* ***Wolbachia* surface protein (WSP) inhibits apoptosis in human neutrophils.** 2007. Parasite Immunol. 29(2):73-79.

BLOUNT, Zachary. BORLAND, Christina. LENSKI, Richard. **Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*.** 2008. PINAS. Vol. 105 no. 23:7899-7906.

BORDENSTEIN, Seth. ROSENGAUS, Rebeca. **Discovery of a novel *Wolbachia* super group in Isoptera.** 2005. Curr Microbiol. 51:393–398.

BOUCHON, Didier. RIGAUD, Thierry. JUCHAULT, Pierre. **Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization.** 1998. Proc R Soc Lond B Biol Sci ;265: 1081–1090.

BOUWMA, M. AHRENS, E. DEHEER, C. SHOEMAKER, D. **Distribution and prevalence of *Wolbachia* in introduced populations of the fire ant *Solenopsis*.** 2006. Insect Molecular Biology 15(1): 89-93.

BRAIG, Henry. ZHOU, Weiguo. DOBSON, Stephen. O'NEILL, Scott. **Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*.** 1998. J. Bacteriol., 180(9):2373-8.

BRATTIG, Norbert. BAZZOCCHI, Chiara. KIRSCHNING, Carsten. REILING, Norbert. BUTTNER, Dietrich *et al.* **The major surface protein of *Wolbachia* endosymbionts in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4.** 2004. J Immunol. 173(1):437-445.

BREEUWER, Johannes. Jacobs, G. ***Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction.** 1996. Exp Appl Acarol 20:421–434.

BREEUWER, Johannes. ***Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestani*.** 1997. Heredity 79: 41-47

BROWER, John. **Cytoplasmic incompatibility: occurrence in a stored-product pest *Ephestia cautella*.** 1976. Ann. Entomol. Soc. Am., 69:1011–1015.

BROWNLIE, Jeremy. O'NEILL, Scott. ***Wolbachia* genomes: insights into an intracellular lifestyle.** 2005. *Curr. Biol.*, 15:507-9.

BUCHNER, Paul. **Endosymbiosis of animals with plant microorganisms.** Interscience, New York – 1965.

CASWELL, Jill. SNODDY, Philip. McMEEL, Darragh. BUICK, Richard. SCOTT, Christopher. **Production of recombinant proteins in *E. coli* using an N-terminal tag derived from sortase.** 2009. *Science Direct*. doi: 10.1016/j.pep.2009.10.012.

DEDEINE, Frank. AHRENS, Michael. CALCATERRA, Luis. SHOEMARKER, Dewayne. **Social parasitism in fire ants (*Solenopsis* spp.): a potential mechanism for interspecies transfer of *Wolbachia*.** 2005. *Mol. Ecol.*, 31;5(1):35.

DONG, Peng. WANG, Jin-Jun. ZHAO, Zhi-mo. **Infection by *Wolbachia* bacteria and its influence on the reproduction of the stored-product psocid, *Liposcelis tricolor*.** 2006. *J. Insect Sci.*, 6:1-7.

DUMLER, Stephen *et al.* **Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the other Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* and *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*.** 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 2145-2165.

DYER, Kelly. JAENIKE, John. **Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes.** 2004. *Genetics*. 168:1443–1455.

FIALHO, Roberto. STEVENS, Lori. **Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle.** 2000. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 267:1469–1473.

GAO, Peng-fei. CAO, Guo-qing. ZHAO, Hui-ting. ZHANG, Gui-xian. JIANG, Yu-suo. WANG, Qin-de. **Molecular cloning and characterization of pigeon (*Columba livia*) ubiquitin and ubiquitin-conjugating enzyme genes from pituitary gland library.** 2009. *International Journal of Biological Science*: 5, 34-43.

GOTTLIEB Yuval *et al.* **Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae).** 2002. *J Invertebr Pathol*. 81:166–174.

GOTOH, T. NODA, H. ITO, S. *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. 2007. Nature. 98: 13-20.

HALLEZ, S. **Gene therapy: technics, strategy and application.** 1995. Rev. Mal. Respir. 12(6): 567-583.

HEATH, Benjamin. BUTCHER, Robert. WHITFIELD, Willian. HUBBARD, Stephen. **Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism.** 1999. Curr. Biol., 25;9(6):313-6.

HERTIG, Marshall. **The Rickettsia, *Wolbachia pipientis* (Gen. et Sp. Nov.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*.** 1936. Parasitology: 28:453–486.

HILDEBRANDT, Pioter. WANARSKA, Marta. KUR, Józef. **A new cold-adapted β -D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c – gene cloning, overexpression, purification and properties.** 2009. BMC Microbiol., 9:151.

HOERAUF, Achin. RAO, Ramakrishna. ***Wolbachia*: a bug's life in another bug.** Ed. Karger – Switzerland. 2007.

HOFFMANN, Ary. **Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*.** 1988. Entomol. Exp. Appl., 48: 61-67.

HOSHIZAKI, S. SHIMADA, T. **PCR-based detection of *Wolbachia*, cytoplasmic incompatibility microorganisms, infected in natural populations of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) in central Japan: has the distribution of *Wolbachia* spread recently?** 1995. Insect Mol. Biol. 4:237–243.

HUIGENS, ME. LUCK, R. KLAASSEN, R. MAAS, M. TIMMERMANS, M. STOUTHAMER, R. **Infectious parthenogenesis.** 2000. Nature. 11;405(6783):178-9.

HUIGENS, E. ALMEIDA, R. BOONS, P. LUCK, R. STOUTHAMER, R. **Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps.** 2004. Proc Biol Sci. 7;271(1538):509-15.

HURST, Gregory *et al.* **Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density.** 2000. Genetics: 156:699–709.

IBBA, Michael. SOLL, Dieter. **Quality Control Mechanisms During Translation.** 1999. Science. vol. 286. no. 5446, pp. 1893-1897.

JACKSON, Alison *et al.* **Cell-free protein synthesis for proteomics.** 2004. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2, 308–319.

JERMUTUS, Lutz *et al.* **Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation.** 1998. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 534–548.

JEYAPRAKASH, A. HOY, M. **Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropods.** 2000. *Insect molecular Biology*, 9, 393–405.

JIGGINS, Francis. HURST, Gregory. MAJERUS, Michael. **Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host.** 2000. *Proc. Biol. Sci.*, 267(1438): 69-73.

JIGGINS, Francis. HURST, Gregory. YANG, Ziheng. **Host-symbiont conflicts: positive selection on an outer membrane protein of parasitic but not mutualistic Rickettsiaceae.** 2002. *Mol. Biol. Evol.*, 19(8):1341-9.

KAGEYAMA Daisuke *et al.* **Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae).** 2002. *Heredity*: 88:444–449.

KAGEYAMA, Daisuke. TRAUT, Walther. **Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with the sex determination of its host *Ostrinia scapularis*.** 2004. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 271, 251–258.

KAMBHAMPATI, Srinivas. BLACK, William., RAI, Karamjit. **Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis.** 1991a. *Heredity*: 67:85-93.

KAMBHAMPATI, Srinivas. RAI, Karamjit. **Mitochondrial DNA variation within and among populations of the mosquito *Aedes albopictus*.** 1991b. *Genome*: 34(2):288-92.

KAMBHAMPATI, Srinivas. RAI, Karamjit. BURGUN, Srouv. **Unidirectional cytoplasmic incompatibility in the mosquito, *Aedes albopictus*.** 1993. *Evolution*: 47: 673–677.

KAMODA, S. *et al.* ***Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in the cricket *Teleogryllus taiwanemma*.** 2000. *J. Exp. Biol.* 203: 2503–2509.

KATZEN, F. FLETCHER, J. YANG, J. VASU, S. PETERSON, T. KUDLICKI, W. **Cell-free protein expression membrane proteins using nanopliprotein particles.** 2008. *Bio.*

Techniques. Vol. 45:5.

KELLER, Laurent. LIAUTARD, Cath. REUTER, Max. BROWN, Willian. SUNDSTROM, Lotta *et al.* **Sex ratio and *Wolbachia* infection in the ant *Formica exsecta***. 2001. *Heredity*: 87: 227-233.

KIM, D., SWARTZ, J. **Improved composition and energy supply for bacterial batch systems. In *Cell-free translation systems***. 2002. (Spirin, AS., ed.), pp. 41–52, Springer.

KITTAYAPONG, Pattamapon *et al.* **Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae)**. 2000. *J. Med. Entomol.*, 37: 340-345.

KITTAYAPONG, Pattamapon. BAIMAI, V. O'NEILL, Scott. **Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus***. 2002. *J. Trop. Med. Hyg.*, 66:108-111.

KLAMMT, C. *et al.* **High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins**. 2004. *Eur. J. Biochem.* 271, 568–580.

KLASSON, Lisa. AANDERSSON, Siv. **Evolution of minimal-gene-sets in host-dependent bacteria**. 2004. *Trends. Microbol.*, 12:37-43.

KLASSON, Lisa. WALTER, Thomas. SEBAIHIA, Mohammed. SANDERS, Mandy. QUAIL, Michael *et al.* **Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group**. 2008. *Mol. Biol. Evol.*, 25 (9), 1877-1887.

KOZAK, Marilyn. **How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA?** *Cell* 15, 1109-1123. 1978.

KOZAK, Marilyn. **Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation**. *Gene* 299, 1-34. 2002.

KRIEGER, B. KELLER, L. **Polymorphism at dinucleotide microsatellite loci in fire ant *Solenopsis invicta* populations**. 1997. *Mol. Ecol.* 6:997-999.

LEGRAND, J. JUCHAULT, P. MOCQUARD, J. MARTIN, G. **Polymorphisme d'origine géographique sur la valence des chromosomes sexuels et phénomènes de monogénie résultant du croisement de différentes populations de *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustace, Isopode terrestre)**. 1980. *Reprod. Nutr. Devel.* 20: 23-59.

LI, H. GANG, H. SUN, Q. LIU, X. MA, Y. SUN, M. **Production in *Pichia pastoris* and characterization of genetic engineered chimeric HBV/HEV virus-like particles.** 2004. *Chin. Med. Sci. J.* 19:78–83.

LI, Pingzuo. ANUMANTHAN, Amekanth. GAO, Xiu-Gong. ILANGOVAN, Kuppusamy. SUZARA, Vicent *et al.* **Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*.** 2007. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142(2):105-24.

LI, Z. WANG, X. MA, J. ZHANG, G. MA, Z. **Cloning and characterization of a tau glutathione S-transferase submit encoding gene in *Gossypium hirsutum*.** 2008. *Genes Genet. Syst.* 83, 219-225.

LO, Nathan. CASIRAGHI, Maurizio. SALATI, Emanuela. BAZZOCCHI, Chiara, BANDI, Claudio. **How many *Wolbachia* supergroups exist?** 2002. *Mol. Biol. Evol.*, 19:341-346.

MAJERUS, Michael. *et al.* **Multiple causes of male-killing in a single sample of the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: coccinellidae) from Moscow.** 2000. *Heredity*: 84: 605–609.

MAKRIDES, Savras. **Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*.** 1996. *Microbiol. Reviews*: 60:512-538.

MALACINSKI, George. **Fundamentos de Biologia Molecular.** Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2005.

MARTIN, G. JUCHAULT, P. LEGRAND, J. **Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* L., dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignée thélygène.** 1973. *CR Acad Sci Paris Ser III*;276: 2313–2316.

MARTINEZ, Monica. GOMEZ, Silvia. EESCRIBANO, José. SAIZ, Juan. FERRER, Neus. VILLAVERDE, Antonio. **DnaK/DnaJ-assisted recombinant protein production in *Trichoplusia ni* larvae.** 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

MASUI, Shinji. KUROIWA, Haruko. SASAKI, Tetsuhiko. INUI, Masashi. KUROIWA, Tuneyoshi *et al.* Bacteriophage WO and virus-like particles in *Wolbachia*, an endosymbiont of arthropods. 2001. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: 283(5):1099-104.

MERÇOT, Hervé. LIORENT, Bertrand. JACQUES, Micheline. ATLAN, Anne. **Variability within the Seycheles cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans*.** 1995.

Genetics: 141: 1015-1023.

MORET, Y. JUCHAULT, P. RIGAUD, T. ***Wolbachia* endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts.** 2001. *Heredity* 86: 325–332.

MORITZ G. **Structure, growth and development;** in Lewis T. 1997. *Thrips As Crop Pests.* Cambridge, University Press. 15–63.

MUNOZ, I. BERGES, Michael. BONSERGENT, Clair. ALINE, Fleur. QUERE, Pascale. **Cloning, expression and functional characterization of chicken CCR6 and its ligand CCL20.** 2009. *Mol. Immun.*, doi:10.1016/j.molimm.2009.07.010.

NEGRI, Ilaria. PELLECCIA, Marco. GREVE, Pierre. DAFFONCHIO, Daniele. BANDI, Claudio. **Sex and stripping the key to the intimate relationship between *Wolbachia* and host?** 2010. *Landes Bioscience*: 3:2, 1-6.

NIRENBERG, Marshal. MATTHAEI, John. **The dependence of cellfree protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides.** 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci.: USA* 47, 1588–1602.

NODA, H. **Cytoplasmatic incompatibility in allopatric field populations of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* in Japan.** 1984. *Entomol. Exp. Appl.* 35: 263-267.

NODA, H. MIYOSHI, T. ZHANG, Q. WATANABE, K. DENG, K. HOSHIZAKI, S. ***Wolbachia* infection shared among planthoppers (Homoptera: Delphacidae) and their endoparasite (Strepsiptera: Elenchidae): a probable case of interspecies transmission.** 2001. *Mol. Ecol.* 10(8):2101-6.

O'NEILL, Scott. GIORDANO, Rosanna. COLBERT, Angela. KARR, Timothy. ROBERTSON, Hugh. **16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects.** 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*: 89(7):2699-702.

O'NEILL, Scott. PETTIGREW, M. ANDREADIS, T. TESH, R. **An in-vitro system for culturing *Wolbachia* symbionts of arthropods.** 1995. *J. Cell. Biochem.*: 21A:210.

PANNEBAKKER, Bart *et al.* **Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae).** 2004. *Genome*: 47:299–303.

PERROT-MINNOT, MJ. GUO, LR. WERREN, John. **Single and double infections with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effects on compatibility.** 1996. *Genetics*. 143: 961-972.

PORKSAKOM, Chantina, NUCHPRAYOON, Surang. PARK, Kiwon. SCOTT, Alan. **Proinflammatory cytokine gene expression by murine macrophages in response to *Brugia malayi* *Wolbachia* surface protein.** 2007. *Mediators Inflamm.*, 2007:84318.

PUNGINELLI, Clair. IZE, Berengere. STANLEY, Nicola. STEWART, Valley. SAWERS, Gary. BERKS, Ben. PALMER, Tracy. **mRNA Secondary Structure Modulates Translation of Tat-Dependent Formate Dehydrogenase N.** 2004. *J. Bacteriol.*: 186(18): 6311-6315.

RASGON, Jason. SCOTT, Thomas. **An initial survey for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections in selected California mosquitoes (Diptera: Culicidae).** 2004. *J. Bacteriol.*: 41:255-257.

RAVI, Maddaly. BALAJI, Shruti. SRINIVASAN, Lakshmi. PAUL, Solomon. **Generation of monoclonal antibodies to surface proteins of human multiple myeloma employing membrane extracts for murine in vivo immunizations.** 2009. *Hybridoma (Larchmt)* 28(5): 369-71.

REED, Kent. WERREN, John. **Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events.** 1995. *Mol. Reprod. Dev.*: 40:408-418.

REUMONT, Bjorn. MEUSEMANN, Karen. SZUCSICH, Nikolaus. AMPIO, Emiliano. SHANKAR, Vivek *et al.* **Can comprehensive background knowledge be incorporated into substitution models to improve phylogenetic analyses? A case study on major arthropod relationship.** 2009. *Evolutionary Biology*: 9:119.

ROUSSET, François. BOUCHON, Didier. PINTUREAU, Bernard. JUCHAULT, Pierre. SOLIGNAC, Michael. ***Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods.** 1992. *Proc. R. Soc. London Ser. B*: 250:91-98.

ROWLEY, Simone. RAVEN, Robert. MCGRAW, Elizabeth. ***Wolbachia pipientis* in Australian spiders.** 2004. *Curr. Microbiol.*: 49:208-214.

SAHDEV, S. KHATTAR, SK. SAINI, KS. **Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existem biotechnology strategies.** 2008. *Mol. Cell. Biochem.* 307: 249-264.

SAMBROOK, Joseph *et al.* **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor. New York. 1989.

SAMRA, ZQ. ATHAR, MA. **Cloning, sequence, expressem and characterization of human β -manosidase.** 2008. Acta Biochimica Polonica - Vol. 55, no. 3; 479-490.

SCHILTHUIZEN, Menno. STOUTHAMER, Richard. **Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps.** 1997. Proc. Biol. Sci.: 22:264 (1380):361-6.

SERBUS, Laura. CASPER-LINDLEY, Catharina *et al.* **The Genetic and Cell Biology of Wolbachia-host Interactions.** 2008. Annu. Rev. Genet.: 42:683-707.

SHIMIZU, Yoshihiro *et al.* **Cell-free translation reconstituted with purified components.** 2001. Nat. Biotechnol.: 19, 751–755.

SHOUMAKER, Dewayne. ROSS, Kenneth., KELLER, Ross. WERREN, John. **Wolbachia infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.)** 2000. Insect Mol. Biol.: 9(6): 661-73.

SINKINS, Scott. BRAIG, Henry. O'NEILL, Scott. **Wolbachia superinfection and the expression of cytoplasmic incompatibility.** 1995. *Proc R Soc Lond B* 261: 325–330.

SOUZA, Rodrigo. RAMALHO, João. MORINI, Maria. WOLF, Luiz. ARAUJO, Ronaldo. MASCARA, Douglas. **Identification and characterization of *Wolbachia* in *Solenopsis saevissima* Fire Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Southeastern Brazil.** 2009. Curr. Microbiol.: 58:189-194.

SPIRIN, AS. **Cell-free translation systems.** 2002. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York, p.p. 197-202, 219-225, 227-233, 235-246.

STOUTHAMER, Richard. BREEWER, Johannes. LUCK, R. WERREN, John. **Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis.** 1993. Nature: 361:66–68.

STOUTHAMER, Richard. KAZMER, David. **Cytogenetics of microbe associated parthenogenesis, consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps.** 1994. Heredity: 73:317–327.

STOUTHAMER, Richard. BREWER, Johannes. HURST, Gregory. ***Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction.** 1999. Annu. Rev. Microbiol.: 53:71-102.

SUAREZ, Andrew. TSUTSUI, Neil. HOLWAY, David. CASE, Ted. **Behavioral and genetic differentiation between native and introduced populations of the Argentine ant.** 1999. Biol. Invas.: 1:43-53.

TORTORA, GJ. FUNKE, BR. CASE, CL. **Microbiologia.** Editora artmed - Porto Alegre. 2000.

TSUTSUI, Neil *et al.* **The distribution and evolutionary history of *Wolbachia* infection in native and introduced populations of the invasive argentine ant (*Linepithema humile*).** 2003. Mol. Ecol.: 12(11):3057-68.

TURELLI, Michael. **Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts.** 1994. Evolution: 48: 1500–1513.

VAN BORM, Steven. WENSELEERS, T., BILLEN, Johan. BOOMSMA, Jacobus. ***Wolbachia* in leafcutter ants: a widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings.** 2001. J. Evol. Biol.: 14: 805-814.

VAN BORM, Steven. WENSELEERS, T. BILLEN, Johan. BOOMSMA, Jacobus. **Cloning and sequencing of *wsp* encoding gene fragments reveals a diversity of co-infecting *Wolbachia* strains in *Acromyrmex* leafcutter ants.** 2003. Mol. Phylogenet. Evol.: 26(1):102-9.

VAN MEER, Marnix. STOUTHAMER, Richard. **Cross-order transfer of *Wolbachia* from *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) to *Drosophila simulans* (Diptera: Drosophilidae).** 1999a. Heredity: 82:163-9.

VAN MEER, Marnix., VAN KAN, F. STOUTHAMER, Richard. **Spacer 2 region and 5S rDNA variation of *Wolbachia* strains involved in cytoplasmic incompatibility or sex-ratio distortion in arthropods.** 1999b. Lett. Appl. Microbol.: 28(1): 17-22.

VAN MEER, Marnix., WITTEVELDT, J. STOUTHAMER, Richard. **Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene.** 1999c. Insect Mol. Biol.: 8(3): 399-408.

VANDEKERCKHOVE, Tom. WATTEYNE, Stephanie. WILLEMS, Anne. SWINGS, Johan.

METENS, Jean. GILLIS, Monique. **Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy.** 1999. *Microbiol. Lett.*: 180(2): 279-286.

VANDEKERCKHOVE, Tom. WATTEYNE, Stephanie. BONNE, W. VANACKER, Danny. DEVAERE, Stijin. RUMES, Bob *et al.* **Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with *Wolbachia pipientis* (a-Proteobacteria).** 2003. *Belg. J. Zool.*: 133, 61–69.

VAVRE, Fabrice. FLEURY, Frederic. LEPETIT, David. FOUILLET, Pierre. BOULETREAU, Michael. **Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations.** 1999. *Mol. Biol. Evol.*: 16(12):1711-23.

VILLA, Riccardo. LOTTI, Marina. GATTI, Pietro. **Components of the *E. coli* envelope are affected by and can react to protein over-production in the cytoplasm.** 2009. *Microbial. Cell. Factories*: 8:32.

WADE, Michael., STEVENS, Lori. **Microorganism mediated reproductive isolation in flour beetles (genus *Tribolium*).** 1985. *Science*: 227:527–528.

WAGNER, Samunel. BADER, Mirjam. DREW, D. GIER, Jan-willem. **Rationalizing membrane protein overexpression.** 2006. *Trends Biotechnol.*: 24(8):364-371.

WEN, Dingyi. VECCHI, Malgorzata. GU, Sheng. SU, Lihe. DOLNIKOVA, Jana *et al.* **Discovery and investigation of misincorporation of serine at asparagine position in recombinant proteins expressed in CHO cells.** 2009. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. 10.1074/jbc.M109.059360.

WENSELEERS, Tim. SUNDSTROM, Leonel. BILLEN, John. **Deleterious *Wolbachia* in the ant *Formica truncorum*.** 2002. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 269: 623-629.

WEEKS, Andrew. BREEUWER, Johannes. ***Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites.** 2001. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*: 268:2245–2251.

WEEKS, Aandrew. MAREC, Frantisek. BREEUWER, Johannes. **A mite species that consists entirely of aploid females.** 2001. *Science*.: 292: 2479–2482.

WERNEGRENN, Jennifer. **For better or worse: genomic consequences of intracellular mutualism and parasitism.** 2005. *Curr. Opin. Genet. Dev.*: 15:572-583.

WERREN, John. WINDSOR, Donald. GUO, Li Rong. **Distribution of *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species.** 1995a. *Insect Mol. Biol.*: 9:393-405.

WERREN, John. JAENIKE, J. ***Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives.** 1995b. *Heredity*: 75:320-6.

WERREN, John. ZHANG, Wan. GUO, Li Rong. **Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods.** 1995c. *Proc. Biol. Sci.*: 22;261(1360):55-63.

WERREN, John. WINDSOR, Donald. GUO, Li Rong. **Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods.** 1995d. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*: 1995;262:197-204.

WERREN, John. **Biology of *Wolbachia*.** 1997. *Annu. Rev. Entomol.*: 42:587-609.

WERREN, John. WINDSOR, Donald. ***Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?** 2000. *Biol. Sci.*: 267: 1277-1285.

WERREN, John. BALSIO, Laura. CLARK, Michael. ***Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology.** 2008. *Nature*: vol. 6. 741-751.

WEST, S.A. *et al.* ***Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities.** *Mol. Ecol.* 7: 1457-1465. 1998.

WRIGHT, John. BARR, Ralph. **The ultrastructure and symbiotic relationships of *Wolbachia* of mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group.** 1980. *J. Ultrastruct. Res.*: 72(1):52-64.

YEN, Janice. BARR, Ralph. **The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*.** 1973. *J. Invertebr. Pathol.*: 1973;22:242-250.

ZEH, David. ZEH, Jeanne. BONILLA, Melvin. ***Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion.** 2005. *Heredity*: 95:41-49.

ZHOU, Weiguo. ROUSSET, François. O'NEILL, Scott. **Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences.** 1998. *Proc. R. Soc. Lond. B.*: 265:509-515.

ZHU, Cong. BYERS, Kelsy. McCORD, Rachel. SHI, Zhenwei. BERGER, Michael *et al.* **High-resolution DNA-Bening specificity analysis of yeast transcription factors.** 2009. *Genome Res.*: 19(4): 556-66.

ZOUCHE, Karima. VORONIN, Denis. TRAN-VAN, Van. MOUSSON, Laurence. FAILLOUX, Anna-bella. **Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*.** 2009. *PLoS ONE* 4(7): e6388. doi:10.1371/journal.pone.0006388.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)